

Über das Vorkommen von Carbonylverbindungen im
Wollfett,
ein Beitrag zur Klärung seiner Autoxydationsempfindlichkeit

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Hermann Vögele
Frankfurt am Main
1962

1963

Gedruckt mit Genehmigung
der Naturwissenschaftlichen Fakultät
der
Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main



1. Gutachter: Prof.Dr. H.Janecke
2. Gutachter: Prof.Dr. C.Rohmann

Tage der mündlichen Prüfung: 7.12. und 10.12.1962
Tag der Promotion: 27.2.1963

Inhaltsübersicht

	Seite
1 <u>Einleitung</u>	5
2 <u>Allgemeiner Teil</u>	9
2.1 Kurzer Überblick über den Chemismus der Autoxydation und deren Beeinflussung durch äußere Faktoren und Katalysatoren	9
2.2 Isolierung von Carbonylverbindungen aus tierischen und pflanzlichen Fetten und Ölen	13
2.3 Autoxydative Veränderungen gesättigter Fett- säuren	16
2.4 Bisherige Kenntnisse über die Autoxydation des Wollfettes	19
2.5 Themastellung	23
3 <u>Allgemeiner Versuchsteil</u>	25
3.1 Ausgangsmaterial	25
3.2 Gewinnung der Carbonylverbindungen aus dem Ausgangsmaterial	25
3.3 Isolierung und Konstitutionsaufklärung der gefundenen Carbonylverbindungen	28
3.4 Alterung von nicht stabilisiertem Adeps lanae anhydricus	43
3.5 Schematische Zusammenfassung	48
3.6 Diskussion	51
4 <u>Experimenteller Teil</u>	56
4.1 Gewinnungsverfahren	56
4.2 Chromatographische Verfahren	58
4.3 Optische Messungen	63
4.4 Halbsynthese verschiedener Steroidketone	67
4.5 Spaltung der DNP-Hydrazone	72
4.6 Extraktion der Steroidketone als Girard-P- Verbindungen aus Wollfett	74
4.7 Bestimmung der Carbonylzahl (COZ) nach R.C. Stillman und R.M. Reed	75
4.8 Begasung des Wollfettes mit Sauerstoff	76
4.9 Reaktion des Hochvakuumtieftemperaturdestil- lates mit Chromotropsäure zum Nachweis des Formaldehyds	76
5 <u>Zusammenfassung</u>	77
6 <u>Literaturverzeichnis</u>	80

1 Einleitung

Um die Jahrhundertwende verdrängte das bei der Reinigung der Schafwolle anfallende Wollfett die bis dahin fast ausschließlich als Salbengrundlage verwendeten tierischen Fette im großen Umfang. Ein Grund dafür waren die im Vergleich zum Wollfett sehr schnell eintretenden Veränderungen im Geruch und in der Konsistenz der Speisefette. Da die Salbengrundlagen, im Gegensatz zu den Nahrungsfetten, meist längere Zeit bis zu ihrer Verwendung lagern, spielt ihre Haltbarkeit für die Pharmazie eine große Rolle.

Von Interesse ist die Zusammensetzung des Wollfettes. Mit der Isolierung und Konstitutionsaufklärung seiner Inhaltsbestandteile wurde ungefähr um die Mitte des vorigen Jahrhunderts begonnen. Im Jahre 1868 hatte F. H a r t m a n n (1) schon auf die Anwesenheit von Cholesterin, dessen Konstitution damals noch nicht bekannt war, hingewiesen. Gleichzeitig stellte er fest, daß das in den tierischen Fetten enthaltene Glycerin in der aus der Schafwolle gewonnenen fettigen Masse nicht vorhanden war, so daß diese im chemischen Sinne nicht als Fett, sondern als Wachs zu bezeichnen ist. Die Ergebnisse von H a r t m a n n konnten wenig später von E. S c h u l z e (2) bestätigt werden, der darüber hinaus noch einen ähnlichen, sich später als ein Steroidgemisch erweisenden Stoff, das Isocholesterin, isolieren konnte. A. W i n d a u s und R. T s c h e s c h e (3) stellten im Jahre 1930 fest, daß dieses Isocholesterin aus mindestens 2 Bestandteilen, dem Lanosterin und Agnosterin, besteht. Durch fraktionierte Kristallisation des Isocholesterinacetats konnten in kleineren Mengen auch ihre beiden Dihydroverbindungen gewonnen werden. Etwa zur gleichen Zeit wie E. S c h u l z e veröffentlichten L. D a r m s t ä d t e r und J. L i f - S c h ü t z (4) eine Arbeit über die Isolierung von 2 Hydroxysäuren, der Lanopalmitinsäure, die später von T. K u w a t a (5) als α -Hydroxypalmitinsäure erkannt wurde, und der Lanocerinsäure mit einer C-Atomzahl von 30, deren Existenz jedoch von mehreren Autoren später bezweifelt wurde. Die darauf einsetzenden Untersuchungen ergaben die Anwesenheit einer Vielzahl verschiedenartiger Säuren. T. K u w a t a und

Ü. I s h i i (6) isolierten geradkettige, gesättigte Carboxylverbindungen von C_{14} bis C_{20} . Große Verdienste um die weitere Aufklärung der sauren Bestandteile erwarb sich A.W. W e i t - k a m p (7), der allein 32 verschiedene Säuren als Methyl-ester auftrennen konnte.

Er fand: 9 n-Säuren, geradzahlige Glieder von C_{10} bis C_{26} ,
2 α -Hydroxysäuren mit 14 und 16 C-Atomen,
10 verschiedene geradzahlige Isosäuren von C_{10}
bis C_{28} mit endständiger Isopropylgruppe,
11 Anteisosäuren mit ungeradzahliger C-Zahl von
 C_9 bis C_{29} und endständiger Isobutylgruppe.

Alle bisher gefundenen Fettsäuren waren nicht oder nur wenig flüchtig. G. S e n f t (8) konnte im Jahre 1957 mit Hilfe pc Methoden mehrere kurzkettige Säuren auftrennen. Er fand n-Säuren mit 5, 9 und 10 sowie eine Isosäure mit 4 C-Atomen. Daneben konnte er Milchsäure nachweisen. Der Versuch, ungesättigte Säuren durch UV-spektrophotometrische Untersuchungen festzustellen, ergab die Abwesenheit dieser für die Beurteilung der Veränderungen im Wollfett so wichtigen Säuren; sie können höchstens in sehr geringen Mengen vorliegen. Bestätigt wurde dieses Ergebnis von D.H.S. H o r n und Y.Y. P r e t o r i u s (9). Außerdem konnten diese 2 ω -Hydroxysäuren mit 30 bzw. 32 C-Atomen isolieren. Auch H.H. W i l l i a m s (10) konnte mehrere Hydroxysäuren nachweisen. Es handelte sich um 4 α -Hydroxysäuren von C_{12} bis C_{18} und eine Hydroxyisosäure mit einer C-Atomzahl von 18.

Neben den bereits erwähnten cyclischen Alkoholen (Cholesterin und Isocholesterin) konnten ungefähr vom Jahre 1950 ab durch systematische Untersuchungen und unter Verwendung moderner analytischer Methoden 26 aliphatische Alkohole isoliert werden. Sie können in einwertige n-Alkohole, zweiwertige n-Alkohole (1,2-Diole), Isoalkohole, Anteisoalkohole und Iso- α -diole unterteilt werden. n-Monoalkohole wurden von C_{18} bis C_{30} , n-1,2-Diole von C_{16} bis C_{24} gewonnen (11,12,13,14). Neben den geradkettigen aliphatischen Alkoholen fanden K.E. M u r r a y und K. S c h o e n f e l d (15) 4 Iso- und 6 Anteisoalkohole, die ersteren mit einer C-Atomzahl von C_{20} bis C_{26} , die letz-

teren von C₁₇ bis C₂₇. H.S. W i l l i a m s (10) wies neben dem schon erwähnten n- α -Diol mit 16 C-Atomen weitere 4 Iso- α -Diole von C₁₈ bis C₂₄ im Vakuumdestillat des Unverseifbaren des Wollfettes nach.

Diese zum größten Teil miteinander veresterten Alkohole und Säuren bilden den Hauptanteil des Wachses. J.C. D r u m - m o n d und L.C. B a k e r (16) stellten bei einer Elementaranalyse des Wollfettes die Anwesenheit von Stickstoff und Phosphor fest. Die nun folgenden Untersuchungen galten der Bindungsart der beiden Elemente. H. J a n i s t y n (17) vermutete eine phosphatidähnliche Substanz. Diese Vermutung wurde durch eine Arbeit von G. S e n f t (8) z.T. bestätigt. Es gelang ihm die Anreicherung des Stickstoffs und Phosphors, und er konnte aus dem N:P-Verhältnis nähere Angaben über die Art der Verbindung machen. Es muß sich um ein kompliziert gebautes Lipoproteid handeln; Lecithin als Bestandteil konnte er ausschließen. Das Hydrolysat der Anreicherung enthielt mehrere Aminosäuren, mehrere Zucker, Inosit und sehr wenig Glyzerin. In Fortsetzung dieser Arbeit konnte W. F ü l l b e r t h (18) mit Hilfe eines besonderen Extraktionsverfahrens und anschließender säulenchromatographischer Reinigung einen einheitlichen Stoff gewinnen. Alkalische und saure Hydrolyse spaltete den Körper in einen lipophilen Anteil, der sich als Cholesterin erwies, und in mehrere hydrophile Stoffe auf: Phosphorsäure, Inosit, einen Peptidanteil (Cysteinsäure, Lysin, Arginin, Serin, Glutaminsäure, Alanin, Valin und Leucin) und verschiedene Zucker (Galaktose, Glukose, Mannose und Arabinose). Glyzerin konnte nicht in dem Lipoproteid ermittelt werden.

Außer den cyclischen Alkoholen befinden sich noch verschiedene Sterinketone im Wollfett. D. D a n i e l und Mitarbeiter (19) isolierten aus dem Unverseifbaren des Wollfettes Cholesta-3,5-dien-7-on und nahmen als dessen Ausgangsprodukt einen 7-Ketocholesterinester an; daneben vermuteten sie ein Gemisch von Cholesta-4,6-dien-3-on und Cholest-4-en-3-on, aber A.H. M i l b u r n und E.V. T r u t e r (20) zeigten, daß Cholest-4-en-3-on und auch Cholest-5-en-3-on nicht im Wollfett anwesend sind. A.H. M i l b u r n, E.V. T r u t e r und F.P. W o o d f o r d (21) entdeckten außerdem 2 Lanosterinketone,

die auch von D.H.S. H o r n (22) in stark oxydiertem Unverseifbaren gefunden wurden. G. S e n f t (8) isolierte ein Cholesterinperoxyd, das sich pc wie das von G.O. S c h e n c k (23) hergestellte und aufgeklärte Cholesterin-7-Hydroperoxyd verhielt und das als Vorstufe des 7-Ketcholesterins gelten kann, sowie ein Isocholesterinperoxyd. Auf die Isolierung dieser Peroxyde und auf Veränderungen des Wollfettes bei der Alterung soll in einem der nächsten Kapitel näher eingegangen werden.

		Seite
2	<u>Allgemeiner Teil</u>	9
2.1	Kurzer Überblick über den Chemismus der Autoxydation und deren Beeinflussung durch äußere Faktoren und Katalysatoren	9
2.1.1	Über die Autoxydation ungesättigter Fettsäuren	9
2.1.2	Kurze Zusammenfassung der die Ranzidität bewirkenden äußeren Einflüsse	11
2.1.3	Über den Einfluß katalytisch wirkender Schwermetalle	12
2.2	Isolierung von Carbonylverbindungen aus tierischen und pflanzlichen Fetten und Ölen	13
2.3	Autoxydative Veränderungen gesättigter Fettsäuren	16
2.4	Bisherige Kenntnisse über die Autoxydation des Wollfettes	19
2.5	Themastellung	23

2 Allgemeiner Teil

2.1 Kurzer Überblick über den Chemismus der Autoxydation und deren Beeinflussung durch äußere Faktoren und Katalysatoren

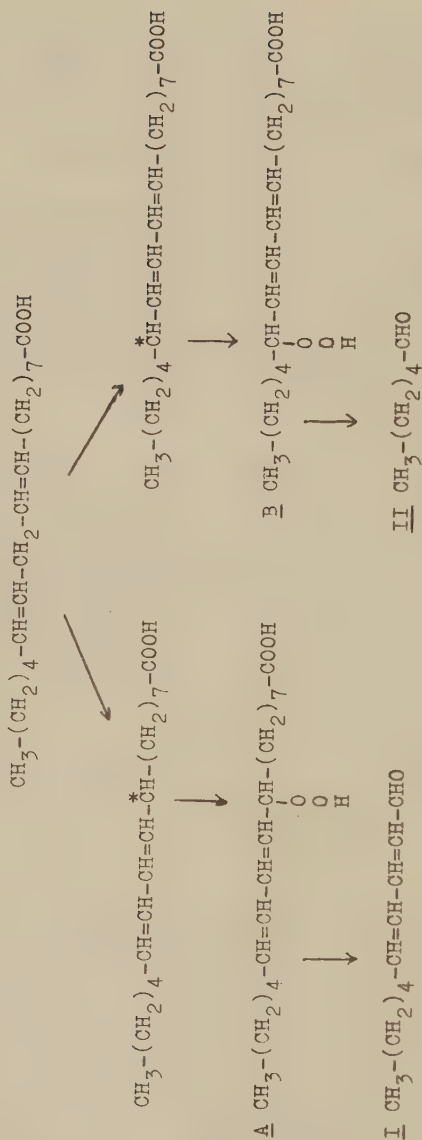
2.1.1 Über die Autoxydation ungesättigter Fettsäuren

Im Laufe der letzten drei Jahrzehnte wurde eine große Anzahl von Arbeiten über die Autoxydation ungesättigter Fettsäuren durchgeführt (24-32). Man variierte die Arbeitsbedingungen. So wählte man hohe oder niedere Temperaturen, oder man arbeitete mit oder ohne Katalysator. Meist wurden die Ammoniumsalze oder die Methylester der Öl-, Linol- oder Linolensäure eingesetzt.

Heute wird allgemein angenommen, daß die Autoxydation der nichtkonjugierten, ungesättigten Fettsäuren mit der Bildung von α -Methylenradikalen beginnt und daß sich die im sog. Propagationsstadium entstandenen Hydroperoxyde unter Bildung von Aldehyden, Ketonen, Ketosäuren usw. zersetzen. Die Hydroperoxyde werden in einer Kettenreaktion der Radikale, die aus der Methylengruppe in direkter Nachbarschaft zur Doppelbindung entstehen, gebildet. Bei der Autoxydation von Linoleat z.B. wird die C_{11} -Methylengruppe vorzugsweise in die Kettenreaktion einbezogen. Die Bildung von 3 isomeren Hydroperoxyden ist hier möglich (Abb. 1).

Die Zersetzungsreaktionen der Linolensäure sind bisher am besten aufgeklärt und sollen stellvertretend für die mit anderen ungesättigten Säuren durchgeführten Oxydationsversuche hier erwähnt werden. Eine ausführlichere Beschreibung der Arbeiten über die Entstehung von Carbonylverbindungen aus anderen ungesättigten Säuren würde über den Rahmen dieser Arbeit hinausgehen, denn, wie schon erwähnt wurde, enthält das zur Analyse verwandte Wollfett keine oder nur geringe Mengen ungesättigter Säuren, die vielleicht bei der Alterung oder bei der Reinigung des Naturproduktes entstanden sein können.

Abb. 1 Schema der Linolensäureoxydation



Erläuterungen

*CH = Methylenradikale

I = Deka-2,4-dienal

A u. B = Isomere Hydroperoxyde

II = n-Hexanal

Neben diesen grundlegenden Untersuchungen, die das Ziel hatten, den Abbau der ungesättigten Fettsäuren während der Lagerung der Fettprodukte zu bestimmten Verbindungen aufzuklären, waren andere Autoren bestrebt, durch Ausschluß schädigender Einflüsse günstigere Lagerbedingungen zu schaffen. Sie bestrahlten verschiedene Fette mit Quecksilberlicht, erwärmten sie auf höhere Temperaturen, setzten Katalysatoren zu usw. und stellten mit Hilfe von Gruppenreagenzien die Entstehung von funktionellen Gruppen, die mit den bei der Oxydation ungesättigter Fettsäuren gebildeten übereinstimmten, in den so behandelten Fetten fest. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sollen in den beiden folgenden Abschnitten kurz beschrieben werden.

2.1.2 Kurze Zusammenfassung der die Ranzidität bewirkenden äußeren Einflüsse

Der Ranzidität von Fetten geht in jedem Fall die Bildung von Peroxyden voraus. Die Peroxydbildung ist eine Kettenreaktion, die von Wärme- und Belichtungsdauer, aber auch von der Sauerstoffmenge abhängig ist (33-36). Bei Zersetzung der Peroxyde entstehen im allgemeinen durch Spaltung von Kohlenstoffketten Aldehyde (37-39). Die Aldehydigkeit eines Fettes kann aber auch durch Kleinlebewesen hervorgerufen werden. Allerdings ist bei dieser Auslegung der Aldehydentstehung eine Einschränkung zu machen. Da die Kleinlebewesen einen geeigneten Nährboden benötigen, reine Fettsäureester jedoch nicht genügen, um sie kräftig wirken und sich entwickeln zu lassen, müssen eiweiß- oder andere stickstoffhaltige Stoffe auch vorhanden sein. Als Beispiel sei die Zersetzung der Fette durch fettspaltende Schimmelpilze in Gegenwart von Wasser in Fettsäuren und niedere Fettester oder Alkohole erwähnt. Die Fettsäuren werden in ihre Ammoniumsalze übergeführt, wobei der Stickstoff aus Eiweiß, aus den Kleinlebewesen selbst oder anderswo herkommen muß. Durch β -Oxydation der Ammoniumsalze entstehen β -Ketosäuren, die wiederum durch Decarboxylierung Methylketone bilden (40,41). Die Keto-

nigkeit kann jedoch auch durch Licht und Wärme hervorgerufen werden (42). Von außerordentlicher Wichtigkeit für die autoxydativen Veränderungen eines Fettes oder Öles ist die Anwesenheit von Metalls Spuren, worauf im folgenden kurz eingegangen werden soll.

2.1.3 Über den Einfluß katalytisch wirkender Schwermetalle

Über die katalytische Wirkung von Schwermetallen sind eine große Anzahl von Arbeiten veröffentlicht worden (43-45). Jedoch sind die Reaktionstemperaturen, die dabei verwandt wurden, nicht mit denen zu vergleichen, die bei der Lagerung eines Fettes oder Öles eingehalten werden. So stellte L.L. D a v i e s (46) fest, daß bei Anwesenheit von $0,7 \cdot 10^{-6}$ g Kupfer in Butter im Laufe von 10-20 Tagen, von $2 \cdot 10^{-6}$ g des gleichen Metalls im Laufe von 4-5 Tagen eine starke geruchliche Veränderung des Fettes auftritt. H.W. Z i e l s und W.H. S c h m i d t (47) bemerkten eine negative Beeinflussung der Stabilität von Baumwollsaatöl durch Metalle. Daß die Erhöhung des Kupfergehaltes in den Nickellegierungen, die zur Herstellung von Ölbehältern benutzt werden, proportional der Instabilität der darin gelagerten Öle ist, wurde von L.L. D a v i e s (48) und auch von F.R. R o b e r t s o n und J.H. C a m p b e l l (49) - letztere verwandten Baumwollsaatöl zu ihren Untersuchungen - beobachtet. A.E. K i n g und Mitarb. (50) schlossen aus Studien über die Stabilität von Schweineschmalz, daß alle Metalle, besonders aber Kupfer, seine Zersetzung beschleunigen. Nach einer neueren Arbeit von C.D. E v a n s und Mitarb. (51) hat Eisen eine noch größere Wirkung auf die Zersetzung von Sojaöl als Kupfer. Da G. S e n f t (8) im Wollfett ebenfalls Spuren von Kupfer und Eisen beobachtete, sind die als Beispiel erwähnten Veröffentlichungen auch für diese Arbeit von Interesse.

Nach den bisher zitierten Arbeiten müssen bei Fetten und Ölen, die ungesättigte Verbindungen, insbesondere ungesättigte Fettsäuren, enthalten, unter gewissen äußeren

Einflüssen während ihrer Lagerung bestimmte Carbonylverbindungen entstehen. Die Bildung von andersartigen Geruchsstoffen in älteren Fettprodukten, die der menschlichen Nase zuwider sind, war der eigentliche Ausgangspunkt dieser Untersuchungen. Schon in kleinen Mengen vorhandene Carbonylverbindungen können diese Geruchsveränderungen hervorrufen. Der Nachweis der einzelnen, in Spuren in dem Fett oder Öl vorkommenden Geruchsstoffe bereitete Schwierigkeiten.

2.2 Isolierung von Carbonylverbindungen aus tierischen und pflanzlichen Fetten und Ölen

Bevorzugte Untersuchungsobjekte waren bisher aus mehreren Gründen die Öle. Der Hauptgrund war wohl der, daß diese infolge ihrer hohen Jodzahl, die auf einem großen Prozentgehalt an ungesättigten Verbindungen schließen läßt, sehr schnell ranzig werden. Entscheidend war weiterhin, daß die flüssigen Öle besser verarbeitbar sind, als die mehr oder weniger festen Fette. Dies trifft wohl besonders für die Alterung der Fettprodukte, die teilweise durch Einleiten von Sauerstoff bei Zimmertemperatur in das Material künstlich hervorgerufen wurde, zu. Es ist auch möglich, daß die Gewinnung der entstehenden flüchtigen Zersetzungsprodukte aus dem flüssigen Material bei tieferen Temperaturen weniger Schwierigkeiten bereitet, als die aus den Fetten.

Die Gewinnungsmethoden für Carbonylverbindungen der einzelnen Autoren unterschieden sich im wesentlichen kaum. Entweder wurden Wasserdampfdestillation unter Vakuum oder Vakuumdestillation allein zur Abtrennung der flüchtigen Bestandteile vom Öl benutzt. Die Bemühungen, das Destillat in die einzelnen, reinen Carbonylverbindungen aufzutrennen, waren meist nicht von Erfolg gekrönt. Die Menge des Destillates reichte nicht aus, oder dieses war so komplex in seiner Zusammensetzung, daß weder eine Säulentrennung, noch eine Auftrennung in einer Craigverteilung noch eine nochmalige, fraktionierte Destillation zum Erfolg führte. Die Carbonylverbindungen wurden daher in ihrer Gesamtheit zu

kristallinen Produkten, meist 2,4-Dinitrophenylhydrazone (DNP-Hydrazone), umgesetzt und diese säulenchromatographisch getrennt. Zur ungefähren Bestimmung der Kettenlänge des Hydrazons konnte die PC verwendet werden. Aufschluß darüber, ob es sich um ein gesättigtes, ein- oder zweifach ungesättigtes Hydrazon handelte, gab die Aufnahme der UV-Spektren der einzelnen Verbindungen. Nachdem diese orientierenden Untersuchungen den Kreis der in Frage kommenden DNP-Hydrazone abgegrenzt hatten, konnte mit Hilfe von Schmelzpunkten und Mischschmelzpunkten, teilweise auch mit Hilfe der IR-Spektren, die Verbindungen identifiziert werden.

Mit diesen Methoden war es verschiedenen Autoren gelungen, aus Ölen mit einem hohen Linol- und Linolensäuregehalt die erwarteten Verbindungen zu isolieren. Zu unterscheiden sind dabei Arbeiten, bei welchen die Verfasser Öle längere Zeit unter Normalbedingungen (Zimmertemperatur, vor Luft- und Lichteinwirkung teilweise geschützt) lagerten oder aber eine beschleunigte Alterung unter Einwirkung von Sauerstoff und sogar bei erhöhter Temperatur durchgeführt wurde. Ob die Analysenergebnisse der beiden Methoden ohne Bedenken vergleichbar sind, ist fraglich. Es ist doch wohl sicher, daß die Temperatur bei fast allen Reaktionen der organischen Chemie eine entscheidende Rolle spielt und die Endprodukte bei Verwendung höherer Temperaturen sich qualitativ, wenigstens aber quantitativ von denen unterscheiden, die beim Arbeiten bei Zimmertemperatur erhalten werden.

Nach diesen Betrachtungen zu den Arbeitsmethoden der bisherigen Untersuchungen der Nahrungsfette und -öle sollen einige dieser Arbeiten erwähnt werden. Eine Reihe von Autoren befaßte sich mit den Zersetzungsprodukten des Sojaöls. H. v o n P e z o l d (52) verwendete sowohl langsam gealtertes als auch unter extremen Bedingungen oxydiertes Sojaöl zur Isolierung von Carbonylverbindungen. Er identifizierte aus beiden Ölen eine größere Anzahl von Aldehyden, wobei sich die bei der natürlichen Alterung entstandenen

z.T. in ihrer Kettenlänge von denen, die sich bei der schnellen Oxydation bildeten, unterschieden. Außerdem konnte er mehrere ein- und zweifach ungesättigte Alkenale, die auch schon von anderen Autoren nicht nur im Sojaöl (53-58), sondern auch in anderen trocknenden Ölen (57,59 60,61) identifiziert wurden, auffinden. Diese Alkenale waren neben Alkanalen ebenfalls bei der Oxydation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren als Reaktionsprodukte nachgewiesen worden.

F.K. K a w a h a r a und H.J. D u t t o n (56) hatten, wie auch H. v o n P e z o l d, neben den ungesättigten Aldehyden eine Anzahl von Alkanalen aus Sojaöl isoliert. Auch J. B r e k k e und G. M a c k i n n e y (62) und D.C. B u s s und G. M a c k i n n e y (63) fanden im Destillat der bei 100° C autoxydierten Mais- und Olivenöle, die beide einen größeren Anteil an einfach ungesättigten Fettsäuren enthalten, ebenfalls mehrere gesättigte Aldehyde. Mit den Autoxydationsprodukten von Milchfett befassten sich eine Reihe von Autoren (64-66). Allen Arbeiten ist gemeinsam, daß die Zahl der gesättigten Carbonylverbindungen diejenige der ungesättigten überwiegt. Noch auffälliger tritt dieses in Untersuchungen, die von A.D. G a d d i s und R. E l l i s (67-69) mit ausgelassenem Schweineschmalz durchgeführt wurden, in Erscheinung.

Die Zahl der Arbeiten läßt sich noch ohne besondere Schwierigkeiten vermehren. Neue Gesichtspunkte kämen aber nicht hinzu. Betrachtet man die erwähnten etwas näher und berücksichtigt die in frischen Fetten und Ölen bisher gefundenen Inhaltsbestandteile, aus welchen die Zersetzungsprodukte entstanden sein müssen, so kommt man zu der Überzeugung, daß nicht nur ungesättigte Verbindungen einer Veränderung unterliegen können, sondern auch gesättigte. Ob diese Spaltung nach einem bestimmten Schema, wie dies bei den Alkenen der Fall ist, und unter welchen Voraussetzungen sie stattfindet, haben sich einige Autoren als Ziel ihrer Untersuchungen gesetzt.

2.3 Autoxydative Veränderungen gesättigter Fettsäuren

Die oxydativen Veränderungen von gesättigten Fettsäuren sind, im Gegensatz zu denen der ungesättigten, bis heute im wesentlichen noch wenig geklärt. Die Gründe, warum auf diesem Gebiet Arbeiten bisher sehr spärlich erschienen, waren wohl folgende: Die Autoxydationsreaktionen treten erst bei höheren Temperaturen in nennenswertem Maße ein, so daß zwar, wenn bei tieferen gearbeitet wird, ein qualitativer Nachweis irgendwelcher Verbindungsgruppen möglich ist, eine Unterscheidung aber nicht getroffen werden kann. Z.T. lag es aber auch daran, daß gesättigte Fettsäuren sehr reaktionsträge sind und nur unter Mitwirkung von Katalysatoren mit Luftsauerstoff reagieren. Dagegen ist die Einwirkung verschiedener Mikroorganismen auf Fettsäuren und deren Abbau zu einem Methylketon mit einem C-Atom weniger als die Ausgangssäure seit langem bekannt. A. H a l l e r und A. L a s s i e u r (40) führten die Bildung von Methylketonen in technischem Kokosfett auf Mikroorganismen zurück. M. S t ä r k l e (41) bestätigte diese Vermutungen durch Reihenversuche, bei welchen er *Penicillium glaucum* auf verschiedene Säuren einwirken ließ.

Neben diesen biologischen Untersuchungen versuchten einige Autoren festzustellen, ob bei der Oxydation der gesättigten Fettsäuren ohne Einwirkung von Kleinlebewesen ebenfalls ein bestimmtes C-Atom bevorzugt von Sauerstoff angegriffen wird. Unterschiedlich waren die Bedingungen, welchen sie Fettsäuren unterwarfen. Ohne Zusatz von Katalysatoren arbeiteten H. T h a l e r und W. S a u m w e b e r (70). Bei der Begasung von Laurin- und Stearinsäure mit Sauerstoff bei erhöhter Temperatur kontrollierten sie den Anstieg der Peroxyd- (PZ) und Säurezahl (SZ) und isolierten die entstandenen Zersetzungsprodukte. Wie aus Arbeiten von E.H. F a r m e r und A. S u n d r a l i n g a m (71) sowie P. G e o r g e und Mitarb. (72)(73) hervorgeht, treten auch bei der Oxydation von gesättigten Kohlenwasserstoffen Hydroperoxyde auf, die bei ihrer Zerstörung unter Sprengung der Kette Aldehyde und durch deren Dehydrierung Säuren mit einer

kürzeren Kette bilden. Die Kontrolle dieser Kennzahlen, wie PZ, SZ und Carbonylzahl (COZ), spielen bei der Erforschung des Oxydationsverlaufs und -grades eine wichtige Rolle. H. T h a l e r und W. S a u m w e b e r isolierten sowohl flüchtige als auch nicht flüchtige Mono- und Dicarbonsäuren sowie Carbonylverbindungen. Nachweisen konnten sie sowohl geradzahlige als auch ungeradzahlige Monocarbonsäuren bis zur Ameisensäure, wobei die niederen Säuren mengenmäßig überwogen. Dieselben Autoren kamen, wie auch andere, die meist katalytische Oxydationsversuche mit höheren und z.T. auch mit niederen Fettsäuren ausführten (74-76), zu der Ansicht, daß die primär gebildeten, noch langkettigen Säuren bevorzugt weitergespalten werden, was den geringeren Anteil an höheren Säuren im Reaktionsgefäß erklären würde. Besonderen Wert legten die Verfasser auf die Identifizierung der Dicarbonsäuren, da außer der von V. R a m a n a t h a n und Mitarb. (77) und C. P a q u o t und F. d e G o u r s a c (75) erwähnten Oxalsäure keine weiteren Angaben über das Vorkommen von Dicarbonsäuren bei der Säureoxydation in der Literatur zu finden sind. Mit Ausnahme der Malonsäure, die sich bei den angewendeten Versuchstemperaturen thermisch zersetzt, konnten sie die Anwesenheit der Dicarbonsäuren von C_2 bis C_{10} nachweisen.

Neben den Carboxylverbindungen identifizierten sie 6 flüchtige n-Aldehyde von C_1 bis C_6 . Das Auftreten des Formaldehyds deuten sie als eine Folge einer ω -Oxydation der Ausgangssäure, im Gegensatz zu V. R a m a n a t h a n und Mitarb., die annahmen, daß die isolierten kurzkettigen Aldehyde Sekundärreaktionen entstammten.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die bei der Oxydation gesättigter Fettsäuren auftretenden Reaktionsprodukte den bei der oxydativen Spaltung ungesättigter Verbindungen nachgewiesenen analog sind. Über Hydroperoxyde, deren Dismutation zu Carbonylverbindungen führt, werden als Endstufe kürzerkettige Carboxylverbindungen, die wiederum einer Spaltung unterliegen können, durch Dehydrierung der Aldehyde ge-

bildet. Der wesentliche Unterschied zu der Oxydation von ungesättigten Verbindungen besteht darin, daß es bei Alkanen keine bevorzugte Angriffsstelle des Sauerstoffes zu geben scheint.

Schon bei Betrachtung der Arbeiten über die Autoxydation der Nahrungsfette fällt eine starke Verschiebung des Verhältnisses von ungesättigten zu gesättigten Oxydationsprodukten zu Gunsten der letztgenannten Verbindungen auf. Die Oxydation von gesättigten Fettsäuren führt wiederum nur zu gesättigten Verbindungen. Im Wollfett, dessen Gehalt an ungesättigten Verbindungen, sieht man von der Doppelbindung im Skelett der Sterine und der in der Seitenkette des Lano- und Agnosterins ab, gering ist, müßten bei dessen Autoxydation fast ausschließlich gesättigte Oxydationsprodukte auftreten. Beim Studium der Literatur über autoxydative Veränderungen des Wollfettes konnten keine Angaben über das Vorkommen von aliphatischen Carbonylverbindungen gefunden werden (19,78-87).

2.4 Bisherige Kenntnisse über die Autoxydation des Wollfettes

Wollfett galt, und das war der Hauptgrund dafür, daß es die tierischen Fette, wie z.B. Adeps suillus, weitgehend als Salbengrundlage verdrängte, als eine stabile, durch äußere Einflüsse wenig in seiner Zusammensetzung veränderliche Trägersubstanz für Externa. Aber schon J. L i f s c h ü t z (78) stellte fest, daß sich bei den im Handel befindlichen rohen Wollfettssorten qualitative und quantitative Unterschiede in der Zusammensetzung zeigten, die bei der Gewinnung dieses Materials durch technische Einwirkungen hervorgerufen werden. Bei der Untersuchung von Schafwolle verschiedener Herkunft bemerkte er, daß das Fett der Haarspitzen eine wesentlich höhere SZ als das der Haarwurzeln aufwies. Außerdem gaben die Haarspitzen im Gegensatz zu den Haarwurzeln unterschiedliche Reaktionen (Oxycholesterin). Er nahm eine Esterspaltung mit darauffolgender Oxydation der freien Alkohole an.

C.H. M ö l l e r i n g (79) versuchte den Einfluss des Lichtes auf die Veränderungen des Wollfettes zu zeigen. Durch vergleichende Untersuchungen von 2 unter verschiedenen Bedingungen gelagerten Wollfettproben einer Charge konnte er feststellen, daß das dem diffusen Tageslicht ausgesetzte Fett nach einer gewissen Zeit eine höhere SZ als eine im Dunkeln gelagerte Probe besaß. Durch Zerlegen einer Probe in einzelne Schichten konnte er weiterhin eine Abnahme der Acidität von oben nach unten nachweisen. In einem weiteren Versuch unterwarf er das Wollfett extremeren Bedingungen. Er bestrahlte es mehrere Std. lang mit einer Quecksilberlampe, wobei nicht nur das intensive Licht, sondern auch die Wärmestrahlung, wie er annahm, einen Anstieg der SZ von 0,28 auf 1,09 bewirkte.

Die ersten Oxydationsprodukte - ob sie für solche allerdings gehalten wurden, geht aus den Ausführungen der Verfasser nicht hervor - isolierten D. D a n i e l und Mitarb. (19) bei der Auftrennung des Unverseifbaren des Wollfettes

an einer Aluminiumoxydsäule. Das zweite Eluat enthielt ein oder zwei ungesättigte Steroidketone, die rechts drehen und bei welchen es sich nach ihren Angaben um ein Gemisch von Cholesta-4,6-dien-3-on und Cholest-4-en-3-on handelt. Aus dem dritten Eluat kristallisierten sie Cholesta-3,5-dien-7-on, das schon von anderen Autoren, z.B. von E. H a r d e g g e r und Mitarb. (80) im Unverseifbaren von sklerotischen menschlichen Aorten gefunden wurde, und von dem man annahm, daß es nicht selbst im Organ vorhanden sei, sondern daß es bei der Verseifung von 7-Ketocholesterinestern entsteht, aus. D. D a n i e l und Mitarb. schlossen daraus, daß das 7-Ketocholesterin als Muttersubstanz des oben erwähnten Ketons in *Adeps lanae anhydricus* enthalten sein muß.

Mit den Oxydationsprodukten des Unverseifbaren befaßten sich auch D.H.S. H o r n und D. I l s e (83). Sie bemerkten, daß schwache Oxydation das Fallen des Steringehaltes und ein Anwachsen des Betrages an harzigen Substanzen bewirkt. Das Harz enthielt das α -Ketensystem, angezeigt durch das Ansteigen des IR-Absorptionsmaximums bei $5,94\mu$, aber keines in der Region von $5,85\mu$ bis $5,86\mu$, was auf die Abwesenheit von Ketonen, deren Doppelbindung nicht mit der Carbonylgruppe konjugiert ist, schliessen läßt. Die Verfasser vermuten die Anwesenheit von 7-Ketocholesterin. Aus dem stark oxydierten Unverseifbaren isolierten sie 2 Dihydrolanosterinketone, die auch von A.H. M i l b u r n, E.V. T r u t e r und F.P. W o o d f o r d (21) im Wollfett gefunden wurden. In Fortsetzung seiner Arbeit über die bei starker Oxydation entstandenen Steroidketone zeigte D.H.S. H o r n (84), daß der harzige Anteil, neben dem bereits erwähnten bei $5,94\mu$, ein Maximum bei $9,8\mu$, welches für die Anwesenheit von gesättigten Ketonen spricht, besitzt. Er schloß daraus, daß bei energischer Oxydation auch die gesättigten Verbindungen des Unverseifbaren angegriffen werden, zumal bei schwach oxydiertem Unverseifbaren der Anstieg der SZ und EZ relativ gering, der Zuwachs an α -Ketonen jedoch beträchtlich ist, bei energischer Oxydation das Umgekehrte gilt. Die Bildung der oxydativen Veränderungen stel-

len sie sich so vor, daß Cholesterin und Isocholesterin, in Form ihrer Wollfettester, zuerst an der aktiven Methylengruppe, die sich in Nachbarschaft zur Doppelbindung befindet, angegriffen werden, um α -ungesättigte Ketone und Alkoholderivate, wahrscheinlich über nicht stabile Hydroperoxyde, zu bilden. Folgereaktionen schliessen wahrscheinlich die Doppelbindung ein und führen zu gesättigten Ketonen und verseifbaren Substanzen.

Über die Veränderung von Wollfettalkohol unter atmosphärischen Bedingungen berichtet N.W. G i l l a m (81); er hat besonders ein merkliches Anwachsen der Acidität beobachtet. Auch G.S. M u i r h e a d und Mitarb. (82) befassten sich mit den Veränderungen physikalischer und chemischer Eigenschaften der unter verschiedenen Bedingungen oxydierten Wollfettalkohole. Sie beobachteten den Anstieg der SZ und VZ, die Verminderung des Acetylwertes und des Cholesterin gehaltes. Bei Emulgierversuchen mit den oxydierten Alkoholen bemerkten sie, daß die Emulsionen nicht mehr die Stabilität hatten, wie es bei mit nicht oxydierten Wollfettalkoholen hergestellten der Fall war. Die Emulsionen brachen beim Rühren; gleichzeitig war eine Erhöhung der SZ in der Ölphase festzustellen.

Das Vorkommen von Peroxyden des Cholesterins bzw. des Isocholesterins in oxydiertem Wollfett stellte G. S e n f t (8) fest. Er konnte mit Hilfe pc Methoden aus dem Unverseifbaren von längerer Zeit gelagertem Wollfett eine Verbindung isolieren, die sich mit Phosphor-Wolframsäure anfärben ließ, und konnte deren Identität mit dem von G.O. S c h e n c k (23) aufgeklärten Cholesterin-7-Hydroperoxyd annehmen. Daß ein Isocholesterinperoxyd ebenfalls darin enthalten sein könnte, war zu vermuten. Er trennte bei der Oxydation von Isocholesterin mit Sauerstoff eine Verbindung pc ab, welche eine ähnliche Reaktion wie das aus dem Unverseifbaren isolierte Produkt zeigte, die aber mangels einer Vergleichssubstanz nicht näher bestimmt wurde.

Da über diese Sterinperoxyde hinaus noch andere Hydroperoxyde, besonders aliphatischer Natur, vermutet wurden und die Dismutation dieser zu Carbonylverbindungen führt, wurde mit Hilfe des K r e i s-Testes bzw. mit S c h i f f-Reagenz auf entstandene Ketone bzw. Aldehyde geprüft. Beide Reaktionen verliefen positiv. Neben dem Nachweis von Carbonylverbindungen bemerkte er, wie andere Verfasser in alternem Wollfett schon öfter feststellten, bei der Begasung des Wachses mit Sauerstoff einen starken Anstieg der SZ.

Eine Erhöhung der Acidität bei der Lagerung, deren Abhängigkeit von äußeren Bedingungen schon öfters erwähnt wurde, beobachtete auch G. N i t s c h k e (86). Nach seinen Feststellungen scheint auch die Wollfettprovenienz bzw. der Fabrikationstyp eine bedeutende Rolle zu spielen, denn bei Lufteinwirkung auf Wollfett aus neuseeländischer, australischer und deutscher Wolle war die Zunahme der SZ bei den erstgenannten größer als bei deutschem Wollfett. Das pharmazeutisch verwendete Adeps lanae anhydricus zeigte jedoch die größte Veränderung. Er schließt daraus, daß die Unterschiede wahrscheinlich von der Zusammensetzung der Fettsäuren abhängen, bei fabrikhergestelltem, wie es Adeps lanae anhydricus ist, aber zersetzende Einflüsse bei der Fabrikation hinzukommen.

Die neueste Arbeit auf dem Gebiete der Wollfettautoxydation kommt aus der Westbrook-Lanolin Company. E.W. C l a r k und G.F. K i t c h e n (87) zeigen durch Kontrolle der SZ und PZ in verschiedenen Schichten eines länger gelagerten Wollfettes, daß die Autoxydation in der Tiefe nur sehr langsam stattfindet. Daneben testeten sie, wie auch schon G. S e n f t (8), eine Reihe von Antioxydantien auf ihre Verwendung für pharmazeutische Zwecke.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß das Wollfett, obwohl es wahrscheinlich keine wesentlichen Mengen an ungesättigten Verbindungen enthält, nicht so stabil ist, wie

man auch heute noch annimmt (88). Der Anstieg der PZ und SZ, die als Maß für den Grad der Oxydation gelten können, reicht aber für die Beurteilung der Ranzidität eines Wachs nicht aus, denn, wie von mehreren Autoren beobachtet wurde, erreicht die PZ sehr früh ihr Maximum und fällt dann auf einen bestimmten Mittelwert ab, so daß längere Zeit gelagertes Wollfett eine niedrigere PZ aufweisen kann, als kurz nach dem Autoxydationsbeginn. Der Grund für den Abfall besteht in der Dismutation der Hydroperoxyde unter Bildung von Sekundärprodukten. Die Erhöhung der Acidität verläuft etwas anders. Die SZ steigt zwar ebenso schnell auf ein Maximum an, verbleibt längere Zeit auf derselben Höhe, um später etwas abzufallen, wahrscheinlich unter Bildung von Polymerisaten. Die vermehrte Säurebildung könnte verschiedene Ursachen haben. Als eine solche käme die Verseifung der im Wollfett vorhandenen Fettsäureester in Frage, die aber wegen der von vielen Autoren erwähnten schweren Verseifbarkeit der Wollfettester nur eine untergeordnete Rolle spielen dürfte. Neben der Esterspaltung sei auf die Möglichkeit der Bildung von Säuren als Oxydationsprodukte, wie sie in vielen Fetten und Ölen beobachtet wurde, hingewiesen. Die Beobachtung, daß eine starke geruchliche Veränderung bei der Alterung eintritt, daß im Unverseifbaren Steroidketone gebildet werden, sowie daß als Sekundäroxydationsprodukte Carbonylverbindungen vorkommen können, führten zu dem Entschluß, eine genauere Untersuchung der entstehenden Aldehyde und Ketone durchzuführen.

2.5 Themastellung

Aufgabe dieser Arbeit sollte daher die Isolierung und Konstitutionsaufklärung von Carbonylverbindungen in gealtertem *Adeps lanae anhydricus* sein.

	Seite
3 <u>Allgemeiner Versuchsteil</u>	25
3.1 Ausgangsmaterial	25
3.2 Gewinnung der Carbonylverbindungen aus dem Ausgangsmaterial	25
3.2.1 Gewinnung der flüchtigen Carbonylver- bindungen	25
3.2.2 Gewinnung von Carbonylverbindungen durch Extraktion	27
3.3 Isolierung und Konstitutionsaufklärung der gefundenen Carbonylverbindungen	28
3.3.1 Flüchtige Carbonylverbindungen	28
3.3.2 Extrahierte Carbonylverbindungen	30
3.3.3 Bemerkungen zu den nicht aufgeklärten Carbonylverbindungen	42
3.4 Alterung von nicht stabilisiertem Adeps lanae anhydricus	43
3.4.1 Untersuchung "natürlich" gealterten Wollfettes	43
3.4.2 Untersuchung von "künstlich" gealtertem Wollfett	45
3.5 Schematische Zusammenfassung	48
3.6 Diskussion	51

3 Allgemeiner Versuchsteil

3.1 Ausgangsmaterial

Als Ausgangsmaterial der Untersuchungen diente ein Wollfett der Wollwäscherei und Kämmerei in Döhren bei Hannover, das infolge längerer Lagerung einen charakteristischen Geruch angenommen hatte, der auf die Zunahme von flüchtigen Bestandteilen hindeutete. Die Violettfärbung des wässrigen Extraktes dieses Wollfettes bei Zugabe von fuchsinschwefliger Säure bildete einen Hinweis auf die Anwesenheit von aldehydischen Verbindungen. Außerdem deuteten Carbonylzahlbestimmungen, die nach R.C. S t i l l m a n und R.M. R e e d (89-91) durchgeführt wurden und die im Durchschnitt bei 98 lagen, auf einen erhöhten Carbonylgehalt hin. Das zur Gewinnung benutzte Wollfett stellte eine zähe Masse dar. In Vorversuchen wurde darin die Anwesenheit von flüchtigen und nichtflüchtigen Carbonylverbindungen nachgewiesen. Zur Gewinnung der flüchtigen Stoffe wurde eine besondere Isolierungsmethode angewandt.

3.2 Gewinnung der Carbonylverbindungen aus dem Ausgangsmaterial

3.2.1 Gewinnung der flüchtigen Carbonylverbindungen

Bei der Isolierung der Ketone und Aldehyde aus dem Wollfett traten verschiedene Schwierigkeiten auf. So war es zu beachten, daß alle leichtflüchtigen, in geringer Menge vorhandenen Stoffe bei falscher Behandlung nicht erfaßt würden: Bei einer normalen Wasserdampfdestillation von etwa 200 g Wollfett roch das Destillat - es wurde in einer Kältemischung aufgefangen - zwar aromatisch, es konnten jedoch keine Carbonylverbindungen als DNP-Hydrazone gefällt werden. Das gleiche Ergebnis hatte eine Vakuumdestillation unter denselben Bedingungen. Extraktionen sowohl mit Aqua dest., als auch mit Äthanol führten zwar nach Fällung mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin zu einer relativ großen Menge eines Gemisches von Hydra-

zonen, die aber bei der pc Trennung für Alkanale und Alkanone nach L. H o r n e r und K. K i r m s e (92) am Startpunkt sitzen blieben. Die weitere Aufarbeitung dieses Gemisches wird noch gesondert behandelt.

Es mußte nun ein Weg gefunden werden, der unter Anwendung von wesentlich tieferen Temperaturen in der Vorlage eine Verflüchtigung der tiefsiedenden Carbonyle verhindert. Auf eine Destillation unter Benutzung einer Kühlfalle in einem Trockeneis-Methanolgemisch als Vorlage wurde verzichtet, da eine Veränderung des Substrates, z.B. durch Spaltung von höhermolekularen Inhaltsstoffen in kurzkettige Carbonyle, befürchtet wurde. Technische Schwierigkeiten, wie z.B. Siedeverzug und leichte Verstopfung der Siedekapillaren sprachen weiterhin gegen die Verwendung von Vakuumdestillationen.

Diesen beiden Gewinnungsmöglichkeiten wurde die sog. Hochvakuumtieftemperaturdestillation (93) vorgezogen, d.h. das Absaugen der flüchtigen Substanzen erfolgte bei etwa 10^{-2} mm Hg mit Hilfe einer Ölpumpe und Aufvangen des Destillates in einer Kühlfalle, die sich in einem Dewargefäß, gefüllt mit einem Trockeneis-Methanolgemisch, befand. Eine Azetonzugabe zur Kohlen säure wurde bewußt vermieden, um durch Eindringen dieses Ketones in das Destillat eine Verfälschung der Ergebnisse zu vermeiden. Das zähe Substrat gab die Aldehyde und Ketone nur langsam ab, so daß das System mehrere Tage lang evakuiert werden mußte. Auf ein Erwärmen des Fettes wurde bewußt verzichtet. Nach vorsichtigem Auftauen des Destillates zeigte sich eine schwach getrübe, intensiv riechende Flüssigkeit, welche neben flüchtigen Carbonylen die schon im Wollfett gefundenen kurzkettigen Fettsäuren (8) enthalten mußte.

Die Gewinnung der bereits erwähnten, wenig oder nicht flüchtigen Carbonylverbindungen soll im folgenden Abschnitt beschrieben werden.

3.2.2 Gewinnung von Carbonylverbindungen durch Extraktion

Zur Gewinnung dieser Aldehyde und Ketone wurde das Fett mit Lösungsmitteln, insbesondere mit Aqua dest. und Äthanol, extrahiert. Bei der Weiterverarbeitung der Extrakte erwiesen sich die wässrigen Lösungen als am brauchbarsten, da bei diesen keine Fettsubstanzen, die die Gewinnung der DNP-Hydrazone erschwerten, aus dem Wachs mitherausgelöst wurden. Um etwa 200 g Wollfett vollständig von den Oxydationsprodukten zu befreien, war eine viermalige Extraktion mit etwa 200 ml dest. Wassers notwendig. Die wässrigen Extrakte hatten einen starken Wollfettgeruch, der auch von anderen Stoffen wie von Carbonylverbindungen hervorgerufen werden kann (niedere Fettsäuren).

Zur Auftrennung und näheren Charakterisierung sowohl der in 3.2.1 als auch der in 3.2.2 im Gemisch erhaltenen Aldehyde und Ketone wurden ihre DNP-Hydrazone hergestellt und diese, wie im folgenden Abschnitt beschrieben, verarbeitet.

3.3 Isolierung und Konstitutionsaufklärung der gefundenen Carbonylverbindungen

3.3.1 Flüchtige Carbonylverbindungen

Die weitere Untersuchung der aus den beiden Gewinnungsprozessen erhaltenen Lösungen verlief auf verschiedenen Wegen. Der Versuch, die flüchtigen, einfachen Aldehyde und Ketone gaschromatographisch zu erfassen, scheiterte an der geringen Konzentration der Substanzen in wässriger Lösung und der Unmöglichkeit ihrer Konzentrierung. Als zweites Verfahren blieb die Überführung der Carbonylverbindungen in ihre DNP-Hydrazone und deren pc Auftrennung und Identifizierung. Die hauptsächlich verwandte pc Methode war die von L. H o r n e r und K. K i r m s e (92) entwickelte, aber auch diejenige von W.S. L y n n, L.A. S t e e l und E. S t a p l e (94), die meist zur Auftrennung von reinen Steroiden genommen wird, konnte mit Erfolg angewandt werden. Nachteilig wirkt sich bei beiden Methoden die große Flüchtigkeit der Fließmittel aus; die erstgenannte verwendet Cyclohexan, die andere Heptan. Schon geringe Temperaturdifferenzen im PC-Entwicklungsgefäß - besonders bei Anwendung der absteigenden Methode - brachten besondere Schwierigkeiten.

Zum eindeutigen Nachweis der einzelnen DNP-Hydrazone wurde daher die Ausgangslösung in breiten Banden absteigend chromatographiert, die aufgetrennten Zonen ausgeschnitten und mit Cyclohexan extrahiert. Die aufsteigende PC ergab nähere Hinweise, mit welchen DNP-Hydrazonen zu rechnen war (Abb. 2 u. 3). Den endgültigen Beweis erbrachte die PC beim gemeinsamen Auftragen der Analysen- und Vergleichssubstanz auf einen Startpunkt (Misch-PC). Zur Erhärtung der Ergebnisse wurden die UV-Spektren der einzelnen Verbindungen mit dem Spektrophotometer DB der Fa. B e c k m a n I n s t r u m e n t s, München, unter Verwendung des Linecompschreibers der Fa. H a r t-

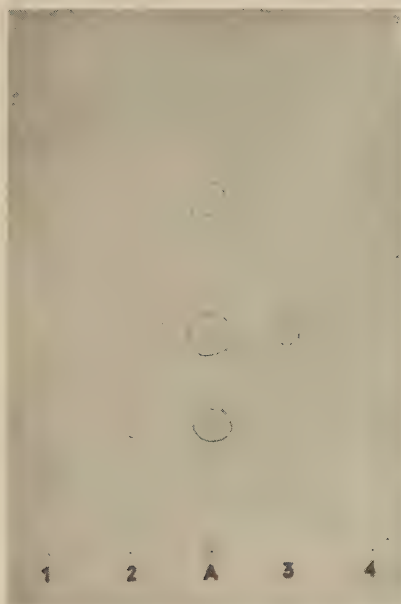


Abb. 2

Pc Trennung der DNP-Hydrazone der Monocarbonylverbindungen.

Methodik : aufsteigend

Fließmittel: Cyclohexan gesättigt mit Dimethylformamid

Imprägniermittel: Dimethylformamid

Erklärung : 1. Methanal
2. Äthanal
3. Azeton
4. Isobutyral
A. Untersuchungs-
lösung



Abb. 3

Pc Trennung der DNP-Hydrazone der Monocarbonylverbindungen.

Methodik : aufsteigend

Fließmittel: Cyclohexan gesättigt mit Dimethylformamid

Imprägniermittel: Dimethylformamid

Erklärung : 1. Isobutyral
2. n-Pentanal
3. n-Hexanal
4. n-Butyral
A. Untersuchungs-
lösung

m a n n & B r a u n, Frankfurt a.M., aufgenommen (s.Abb.4). Zur genaueren Ermittlung der Maxima wurde das Gerät DU der Fa. B e c k m a n I n s t r u m e n t s verwandt, und die Kurvenausschnitte mit einem Punktschreiber der Fa. H a r t m a n n & B r a u n aufgezeichnet.

Es konnten nachgewiesen werden: Methanal, Äthanal, Isobutanal, n-Pentanal, n-Hexanal, n-Heptanal und Azeton. Das Destillat zeigte auch eine deutliche Violettfärbung mit Chromotropsäure, mit einem Maximum bei 567 μ und einem Minimum bei 544 μ , ein weiterer Beweis für die Anwesenheit von Formaldehyd.

Die Konstitutionsaufklärung der zweiten Gruppe von Aldehyden und Ketonen verlief anders wie die der Monocarbonylverbindungen, was im folgenden beschrieben wird.

3.3.2 Extrahierte Carbonylverbindungen

Die DNP-Hydrazone des wässrigen Extraktes ließen sich mit den oben erwähnten pc Methoden (92,94) nicht auftrennen. Sie blieben als ein intensiv rotbraungefärbter Fleck am Startpunkt sitzen. Danach wurden dünn-schichtchromatographische (DCh) Vorversuche auf schmalen Dünnschichtplatten, die mit Kieselgel G "Merck" bestrichen worden waren, durchgeführt. Als Reihenfolge der Verteilungsflüssigkeiten wurde die H e c k e r ' sche Reihe gewählt. Es wurde mit den lipophilen Flüssigkeiten begonnen, bei welchen das DNP-Hydrazonegemisch am Startpunkt sitzen blieb, und so das geeignetste Fließmittel ermittelt. Am günstigsten erwies sich Chloroform "Merck" mit einem Zusatz von 1% Äthanol. Das unter Verwendung dieses Fließmittels entstandene Chromatogramm zeigt Abb. 5. Das Hauptaugenmerk wurde auf die mit 1,2,5 und 7 bezeichneten, in größerer Menge auftretenden DNP-Hydrazone gerichtet.

Da in dem Fett nach früheren Arbeiten von D. D a n i é l und E. L e d e r e r (19) sowie von A.H. M i l b u r n,

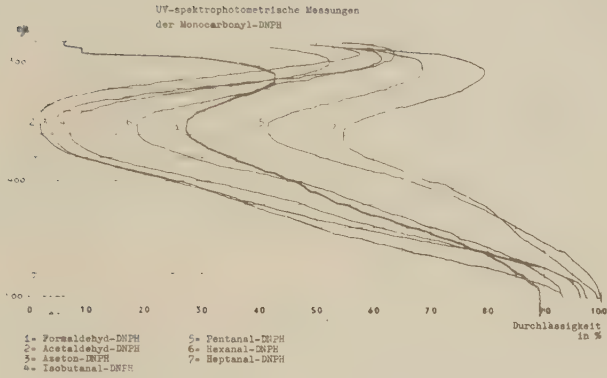


Abb. 4 UV-spektrophotometrische Messungen
der Monocarboxyl-DNP-Hydrazone

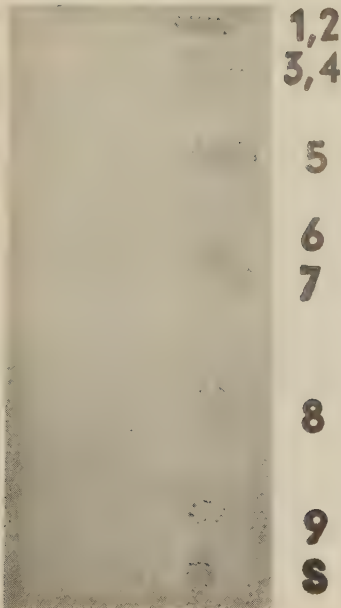


Abb. 5

Dünnschichtchromatographi-
sche Auftrennung der DNP-
Hydrazone des wässrigen
Extraktes

Fließmittel: Chloroform mit
Zusatz von 1%
Äthanol

E.V. T r u t e r und F.P. W o o d f o r d (21) Oxydationsprodukte der den Hauptanteil im Adeps lanae anhydricus ausmachenden Sterine gefunden wurden, so lag es nahe, daß auch hier entweder die gleichen oder andere Sterinketone vorlagen. Gestützt wurde die Annahme durch das Ergebnis einer 8-tägigen Begasung von Cholesterin in wässriger Emulsion, wobei die mit 5 und 7 bezeichneten Hydrazone ebenfalls entstanden. Eine Synthese der bereits erwähnten Ketone (s.S.19-21) war nicht zu umgehen, um die schon von anderen Autoren gefundenen Carbonylverbindungen durch PC von der Konstitutionsaufklärung auszuschließen.

Das von D. D a n i e l und E. L e d e r e r (19) isolierte und auch bei der Autoxydation von Cholesterin gefundene 7-Ketocholesterin (Schmp. 170°C) (95) und das bei der Verseifung der Ester des ersteren entstehende Cholesta-3,5-dien-7-on (Schmp. 114°C) konnten durch Oxydation des Cholesterinacetats mit Chromsäureanhydrid bei 55°C (96) und Verseifung des Oxydationsproduktes erhalten werden. Die restlichen, ebenfalls bereits von o.a. Autoren gefundenen Cholesterinketone, bei welchen die alkoholische Gruppe am C_3 oxydiert ist und teilweise eine Umlagerung der Doppelbindung stattgefunden hat oder eine zweite hinzugekommen ist, wurden wie folgt synthetisiert (Abb. 6):

Das Cholest-5-en-3-on (IV) wurde aus Cholesterin (I) über das Cholesterin- $5\alpha,6\beta$ -dibromid (II) (97) zum Cholestenondibromid (III) mit Chromsäure oxydiert (98). Die Abspaltung des Broms erfolgte mit Zinkstaub in alkoholischer Lösung (99). Schmp. 127°C

Die Synthese des Cholesta-4,6-dien-3-on (V) verlief analog der des obigen Ketones bis zum Cholestenondibromid (III). Das Brom wird hier durch Schütteln der ätherischen Lösung des Dibromids mit einer schwachsauren Silbernitratlösung entfernt, wobei die beiden Doppelbindungen entstehen (100). Schmp. des DNP-Hydrazons: $232-233^{\circ}\text{C}$

Cholest-4-en-3-on (VI) wird nach der Synthese von O. Die ls und E. A b d e r h á l d e n (101) durch Oxydation von Cholesterin (I) mit Kupfer-II-oxyd bei 280-300° C hergestellt.

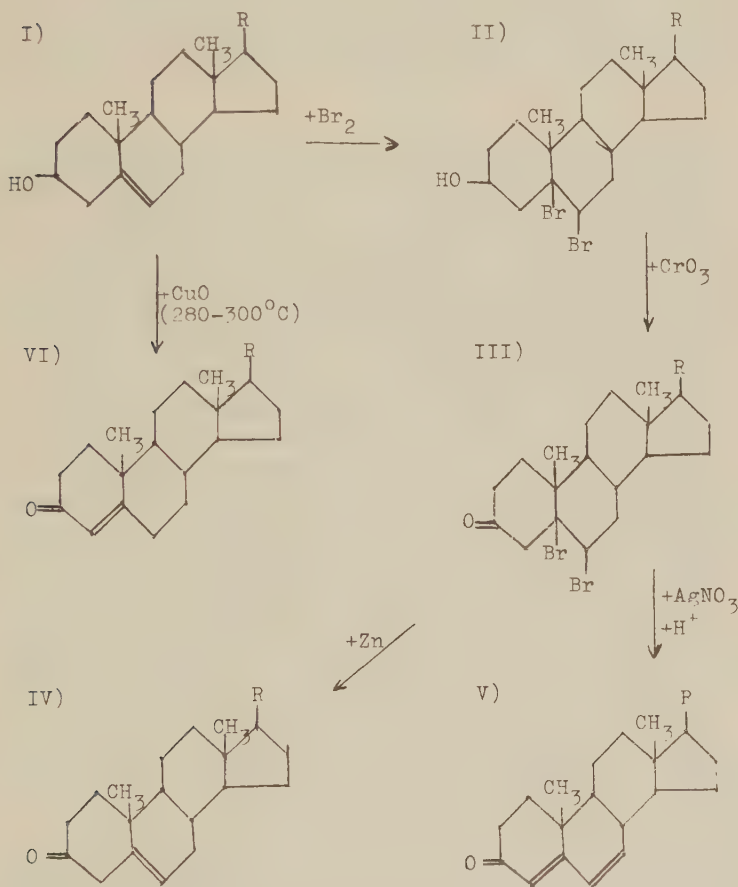
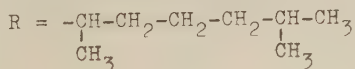


Abb. 6 Synthese von am C₃ oxydierten Cholesterinketonen

- | | |
|---|---------------------------|
| I) Cholesterin | IV) Cholest-5-en-3-on |
| II) Cholesterin-5 α ,6 β -dibromid | V) Cholesta-4,6-dien-3-on |
| III) Cholestenondibromid | VI) Cholest-4-en-3-on |



Die beiden Lanosterinabkömmlinge, von A.H. M i l l b u r n, E.V. T r u t e r und F.P. W o o d f o r d (21) im Wollfett gefunden, konnten durch Oxydation von Dihydrolanosterin (102), das wiederum aus Isocholesterinacetat durch Hydrierung bei 70° C und Platinoxid als Katalysator hergestellt wurde, synthetisiert werden.

Nach Überführen der Sterinketone in ihre DNP-Hydrazone wurden ihre RF-Werte bei der DCh ermittelt. Alle Cholesterinketone, sowohl die am C₇ als auch die am C₃ oxydierten, liefen kurz hinter der Fließmittelfront, während die beiden Lanosterinketone unterhalb der mit 5 und 7 (Abb. 5): bezeichneten Hydrazone hängen blieben. Es konnte aus diesem Verhalten geschlossen werden, daß es sich bei den mit 1 und 2 bezeichneten Hydrazonen um 2 der von D. D a n i e l und Mitarb. aus Wollfett isolierten Ketone handelte. Mit Hilfe der von H. N e h e r und A. W e t t s t e i n (103) entwickelten pc Methode für Oxosterin-DNP-Hydrazone konnte festgestellt werden, daß die Substanzen 1 und 2 am C₇ oxydierte Cholesterinabkömmlinge sein mußten. Sie trennten sich nach diesem Verfahren nicht auf, hatten aber die gleichen RF-Werte wie die Vergleichshydrazone des 7-Ketocholesterins und des Cholesta-3,5-dien-7-on. H. N e h e r und A. W e t t s t e i n hatten diese Methode zur Auftrennung der DNP-Hydrazone von Steroidhormonen benutzt. Bei den Hydrazonen der Cholesterinketone war mit ihr nur eine Unterscheidung der an verschiedenen Stellen oxydierten Cholesterine möglich.

Zur näheren Untersuchung war die Isolierung einer größeren Menge der 4 Hydrazone nötig. Da eine säulenchromatographische Auftrennung trotz längerer Versuche mit verschiedenem Säulenfüllmaterial (Aluminiumoxyd, Hostalen, mehrere Celite, Kieselgel "Merck" u.a.) und unterschiedlicher Imprägnierung des Materials (Dimethylformamid, Nitromethan (65) u.a.) keine befriedigenden Ergebnisse brachte, wurden die DNP-Hydrazone nach vorherigem Umkristallisieren aus Äthanol in Chloroform gelöst und auf größere Dünnschicht-

platten in voller Breite aufgetragen. Die aufgetrennten Zonen konnten mit Hilfe eines kleinen Messers abgehoben und aus dem Kieselgel G mit Chloroform eluiert werden. Nach dem Abdestillieren und Verjagen des restlichen Chloroforms und Umkristallisieren des Rückstandes aus Äthanol (95 Vol.%) konnten die Verbindungen 5 und 7 rein, 1 und 2 im Gemisch in Mengen von 10-20 mg isoliert werden.

Da die beiden Steroidketone 1 und 2 nur im Gemisch vorlagen, und Schmelzpunkt und Mischschmelzpunkt als Beweise ausschieden, mußte hier die Spaltung der Hydrazone in die reinen Ketone Aufklärung bringen. Sie wurde in salzsaurer Azetonlösung mit Zinn-II-chlorid (104) in der Hitze durchgeführt. Nach Abdestillieren des Azetons konnten sie mit einem Petroläther-Benzol(8%)-Gemisch ausgeschüttelt und auf einer Säule, gefüllt mit Aluminiumoxyd "Woelm", Aktivitätsstufe I, aufgetrennt werden (19). Zur Identifizierung wurden vergleichende Messungen der UV-Spektren der isolierten Ketone und der Vergleichssubstanzen durchgeführt (Abb. 7). Nach erneuter Fällung der Steroidketone mit 2,4-Dinitrophenylhydrazin konnten sowohl die Schmelzpunkte als auch Mischschmelzpunkte mit den Vergleichs-DNP-Hydrazonen gemacht werden. Einen weiteren Nachweis, daß es sich um 7-Keto-Cholesterin und um Cholesta-3,5-dien-7-on handelt, erbrachten die UV-Vergleichsmessungen der DNP-Hydrazone.

Die Aufklärung der Verbindungen 5 und 7 (Abb. 5) gestaltete sich schwieriger. Obwohl die Carbonyle als DNP-Hydrazone kristallin, wenn auch nur in einer Menge von je 5 mg, vorlagen, und ihre Schmelzpunkte gemessen wurden, war die Konstitutionsaufklärung mit größeren Schwierigkeiten verbunden. Wenn es sich um Cholesterinketone handeln würde - und das war aus dem Ergebnis der Begasung des Cholesterins zu entnehmen - würde das IR-Spektrum der Hydrazone nicht viel über die Stellung der Keto- oder Hydroxylgruppen aussagen. Daß es keine Monoketone waren, konnte durch

Besprühen der DNP-Hydrazone mit alkoholischer Kalilauge mit einiger Sicherheit festgestellt werden, denn alle Alkanale und Alkanone, aber auch die ungesättigten Ketone und Aldehyde der Kettenkohlenwasserstoffe färben sich mit Lauge braun bzw. rot, während die vorliegenden eine Violettfärbung aufwiesen. Nach einer Arbeit von H.H. S t r a i n (107) werden die DNP-Hydrazone von Dicarbonylverbindungen beim Besprühen mit Lauge violett. Es konnte sich daher um ein Dikosterin handeln, denn auch das Hydrazon des Lanost-8-en-3-ol-7,11-dion zeigte bei Behandlung mit Lauge die gleiche Farbe.

Bei der PC nach H. N e h e r und A. W e t t s t e i n (103) blieben sowohl Substanz 5 als auch 7 sogar bei längerem Durchlauf am Startpunkt hängen, ebenso das Diketon des Dihydrolanosterins. Zur weiteren Klärung war die Aufspaltung der beiden Hydrazone notwendig. Da aber die zur Verfügung stehenden Mengen der zu spaltenden Stoffe zu gering waren, mußte eine ergiebige Quelle gefunden werden, die eine größere Menge der beiden liefert. Die Begasung von Cholesterin, sowohl ohne als auch mit katalysierenden Zusätzen, hatte eine zu geringe Ausbeute. Oxydationsversuche mit verschiedenen anorganischen Oxydantien, wie Kaliumpermanganat, Wasserstoffperoxyd, Salpetersäure u.a., in verschiedenen Lösungsmitteln und auch in wässriger Emulsion, brachten keine befriedigenden Ergebnisse. Zum Schluß wurde auf das eigentliche Ausgangsmaterial, das Wollfett, zurückgegriffen und dieses unter verschiedenen Bedingungen mit Sauerstoff begast. Die größte Ausbeute lieferte die Begasung des Wollfettes bei ca. 30-40° C in leichtgeschmolzenem Zustand und unter Zugabe der gleichen Menge an Wasser. Daß diese Behandlung des Waxes mit den natürlichen Einflüssen, unter welchen es normaler Weise steht, und den dadurch bedingten Veränderungen der Inhaltsbestandteile nicht zu vergleichen war, erschien selbstverständlich. Das Hauptziel, die vermehrte Bildung der beiden gewünschten Oxydationsprodukte, wurde jedoch erreicht.

Abb. 7 Vergleichsmessung von isoliertem und hergestelltem 7-Ketocholesterin im UV-Spektralphotometer

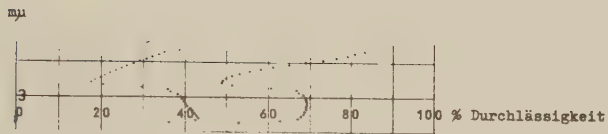
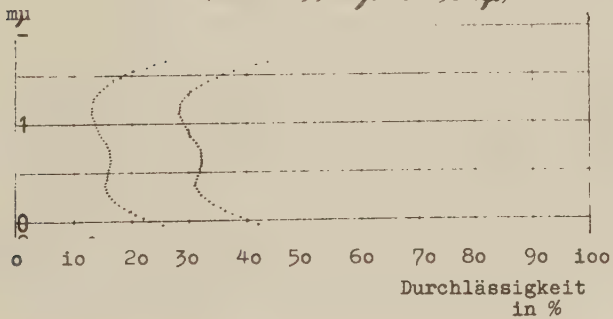


Abb. 8

Vergleichsmessung von isoliertem
und authentischem Glyoxal-DNPH
(Maxima: 394 mμ u. 438 mμ)



Nachdem von beiden Substanzen (5 und 7), wie beschrieben, etwa 20 mg isoliert worden waren, konnte ihre Spaltung durchgeführt werden. Wegen der Schwerlöslichkeit von Substanz 5 in Azeton wurde sie in Essigsäure gelöst und mit Zinn-II-chlorid in konzentrierter Salzsäure eine Std. lang am Rückflußkühler erhitzt. Nach dem Abkühlen wurde die essigsäure Lösung stark mit Wasser verdünnt, mit Äther ausgeschüttelt und dieser nach dem Trocknen mit Natriumsulfat im Vakuum abdestilliert. Das Destillat wurde in einem Trockeneis-Methanolgemisch aufgefangen. Zurück blieben einige intensiv riechende Tröpfchen einer wässrigen Lösung, aber keine in Wasser schwer lösliche Festsubstanz, wie das Steroide zu sein pflegen. Extraktionen mit anderen organischen Lösungsmitteln zeigten dasselbe Ergebnis. Nach diesen Erkenntnissen war die Wahrscheinlichkeit, daß es sich bei 5 und 7 um Steroidketone handelt, sehr gering geworden. Die abdestillierten, organischen Lösungsmittel wurden daraufhin mit einer alkoholischen 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung zur Überführung der evtl. mit übergegangenen flüchtigen Carbonyle in ihre DNP-Hydrazone am Rückflußkühler erhitzt. Die pc Untersuchung nach L. H o r n e r und K. K i r m s e (92) ergab das Vorhandensein von Azeton- und Acetaldehyd-DNP-Hydraxon. Letzteres ist wahrscheinlich durch Reduktion der Essigsäure entstanden, Azeton möglicherweise ein Spaltprodukt der ursprünglichen Substanz. Im Rückstand der Vakuumdestillation konnten neben dem Ausgangsmaterial die beiden Hydrazone ebenfalls nachgewiesen werden.

Einen weiteren Hinweis, daß 5 und 7 keine Steroidketone sein konnten, erbrachte die Überführung der Carbonylverbindungen in ihre Girard-P-Verbindungen (105) und deren Extraktion aus dem Wachs. Das in Alkohol gelöste Wachs wurde mit Girard-P-Reagenz ($[(CH_3)_3-N^+-CH_2-CO-NH-NH_2] Cl^-$) eine Zeit lang auf einem Wasserbad erwärmt. Nach Ausfällung der wasserunlöslichen Bestandteile und deren Extraktion mit Äther verblieben die Girard-P-Carbonylverbindun-

gen in der wässrigen Phase und konnten durch Erwärmen mit einer Mineralsäure in ihre Bestandteile zerlegt werden. Der ätherische Extrakt der wässrigen Phase mußte die schwer wasserlöslichen Bestandteile, also auch die Steroidketone, enthalten. Die Fällung als DNP-Hydrazone und deren dch Identifizierung zeigte ein überraschendes Ergebnis: Es konnten nur die bereits als Cholesterin-Ketone identifizierten gefunden werden. Dieses Ergebnis konnte zweierlei aussagen. Entweder waren die Reinsubstanzen von 5 und 7 so gut wasserlöslich, respektive schwer ätherlöslich, daß sie nicht mit Äther extrahiert wurden, oder sie hatten sich beim Eindampfen des Ätherextraktes auf dem Wasserbad mit dem Lösungsmittel verflüchtigt. Die Fällung der in der wässrigen Phase zurückgebliebenen Carbonylverbindungen als DNP-Hydrazone deutete auf die erste Vermutung hin, da sich sowohl 5 als auch 7 noch in der wässrigen Lösung befanden.

Um Aufschluß über die Flüchtigkeit der Substanzen 5 und 7 zu erhalten, wurde die aus der Hochvakuumtieftemperaturdestillation gewonnene Lösung der DNP-Hydrazone dch untersucht und als Vergleich die bei der Extraktion gewonnenen Hydrazone aufgetragen. Es zeigte sich, daß 5 und 7 auch in diesem Destillat, wenn auch in sehr viel geringerer Menge, zu finden waren.

Der Gedanke lag nun nahe, daß es sich um Hydroxyaldehyde oder -ketone oder um Dialdehyde oder Diketone handeln mußte. Vergleichshydrazone der oben genannten Stoffe wurden hergestellt und als Vergleich neben 5 und 7 auf Dünnschichtplatten laufen gelassen. Das einfachste Dihydroxyketon, das Dihydroxyazeton und der einfachste Dialdehyd, das Glyoxal, liefen dch mit 7 und 5 auf gleicher Höhe, und auch beim Aufeinandertragen von Analysen- und Vergleichssubstanz erfolgte keine Auftrennung. Auf das Vorhandensein von Dihydroxyazeton wies schon das bei der Spaltung des DNP-Hydrazons 7 in seine Komponenten entstehende Azeton hin. Ein pc Verfahren (106), geeignet sowohl zur Auftrennung der DNP-Hydrazone von Mono- als auch der von Di- und Hydroxy-

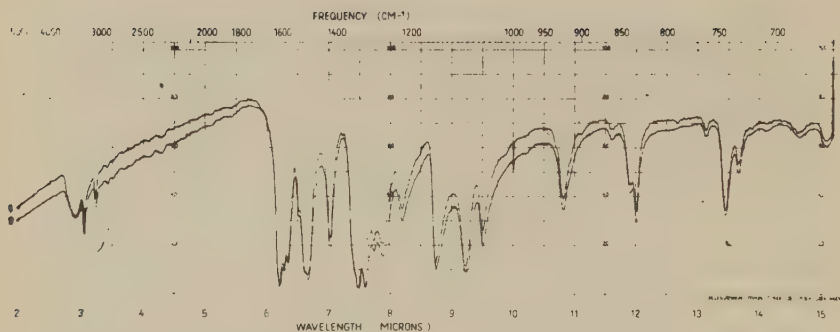


Abb. 9 IR-Vergleichsspektren von isoliertem und authentischem Glyoxal-DNP-Hydrazone

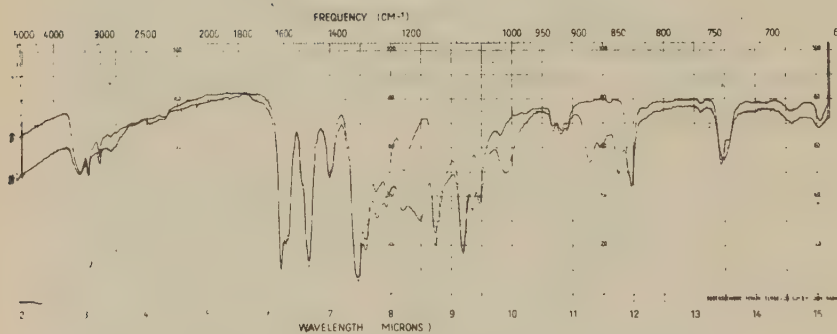


Abb. 10 IR-Vergleichsspektren von isoliertem und hergestelltem Dihydroxyazeton-DNP-Hydrazone

carbonylverbindungen der Paraffine, hatte das gleiche Ergebnis. Zur Erhärtung der chromatographischen Nachweise wurden UV-spektrophotometrische Vergleichskurven (s. Abb. 8) aufgenommen, wobei sowohl Glyoxal- als auch Dihydroxyazeton-DNP-Hydrazon zwei Maxima an der gleichen Stelle aufwiesen (bei 438 und 394 m μ).

Um letzte Zweifel zu beseitigen, wurden die IR-Spektren der DNP-Hydrzone des Dialdehyds und Dihydroxyketons neben denen der authentischen Stoffe aufgenommen und verglichen. Die Messungen wurden mit dem IR-Spektrophotometer Nr. 221 der Fa. P e r k i n - E l m e r* durchgeführt. Die Abb. 9 u. 10 zeigen eine deutliche Übereinstimmung der Kurven des isolierten und des authentischen Materials. Lediglich beim Vergleich der beiden Dihydroxyazetonkurven treten Unregelmäßigkeiten auf, was aber auf die Tatsache zurückgeführt werden kann, daß das aus käuflich erworbenem Dihydroxyketon hergestellte DNP-Hydrazon mit Reagenz verunreinigt war, da es nicht, wie das isolierte, aus Nitrobenzol umkristallisiert wurde.

Da die Aldehyde und Ketone, deren Konstitution aufgeklärt wurde, nicht allein im wässrigen Extrakt zu finden sind, wie aus dem DCh (s. Abb. 5) hervorgeht, die restlichen Verbindungen jedoch in wesentlich geringeren Mengen darin enthalten waren, können nur einige Hinweise auf deren Konstitution gemacht werden.

* Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co., GmbH., Überlingen/See

3.3.3 Bemerkungen zu den nicht aufgeklärten Carbonylverbindungen

Wie das Chromatogramm in Abb. 5 zeigt, sind im wässrigen Extrakt des Ausgangsmaterials neben den identifizierten Steroidketonen, Glyoxal und Dihydroxyazeton eine Reihe weiterer Verbindungen, wenn auch schwächer, zu erkennen. Bei 3 der restlichen doch isolierten Hydrazonen reichte die gewonnene Menge aus, um die UV-Spektren aufzunehmen. Die beiden Maxima, die auf der gleichen Höhe wie die des Glyoxals und des Dihydroxyazetons lagen, deuten auf Verbindungen ähnlicher Art hin. Die geringe Ausbeute reichte jedoch nicht zur näheren Klärung der Konstitution.

Bei dem Versuch, die Steroidketone doch weiter aufzutrennen, was auf Kieselgel G-Platten mit Toluol als Fließmittel gelang, trat zwischen dem Cholesta-3,5-dien-7-on, das ziemlich weit unten hängen blieb, und dem 7-Ketocholesterin ein weiteres DNP-Hydrazon, das mit den synthetisierten Cholesta-3-onen auf gleicher Höhe lag, auf. Ob es sich um eine einheitliche Substanz oder um ein Gemisch handelte, konnte nicht geklärt werden. Vermutet wird, daß es sich um den oder um die gleichen Stoffe, die D. D a n i e l und Mitarb. (19) aus dem Unverseifbaren des Wollfettes isolierten, handelt.

Da die pc Identifizierung der Monocarbonylverbindungen zwar eindeutig, aber doch noch nicht als ausreichend erachtet wurde, wurde versucht, sie durch eine schnelle Alterung von frischem Wollfett in größeren Mengen zu gewinnen und nach Auftrennung die Schmelzpunkte und Mischschmelzpunkte der DNP-Hydrazone zu bestimmen.

3.4. Alterung von nicht stabilisiertem Adeps lanae naturalis

3.4.1. Untersuchung "natürlich"gealterten Wollfettes

Auf großen Glasplatten, die an einem stets geschlossenen Fenster des Labors ausgelegt wurden, wurde frisch hergestelltes, nicht stabilisiertes Wollfett der Westbrook Lanolin Company, Bradford/England in einer Schichtdicke von ca. 1 cm mit einem Spatel ausgestrichen und längere Zeit dem Luftsauerstoff und Sonnenlicht ausgesetzt. Der Zusatz "natürlich" darf nur mit gewissen Einschränkungen gebraucht werden, da verschiedene Bedingungen, die bei dieser oxydativen Veränderung des Wachses eine Rolle spielen, bei in Porzellan- oder Blechgefäßen aufbewahrt Wachs nicht gegeben sind. Einen großen Einfluß wird die durch das Ausstreichen bedingte Vergrößerung der Oberfläche und wesentlich geringere Schichtdicke haben, sowie die Möglichkeit der Beeinflussung durch den Luftsauerstoff. Als wesentlicher Faktor tritt das Sonnenlicht hinzu, das bei dem in geschlossenen Gefäßen aufbewahrten Wachs fast keinen Einfluß hat.

Während des Versuches wurden in regelmäßigen Abständen zur Kontrolle der im Fett eingeschlossenen Carbonylmengen Carbonylzahlbestimmungen nach R.C. Stillman und R.M. Reed (89-91) durchgeführt. Die ermittelten Ergebnisse sind in der folgenden Tabelle (Tab. 1) aufgeführt. Abb. 11 zeigt die graphische Darstellung des Anstiegs der COZ.

Tab. 1 Anstieg der COZ

Monate	1.5	2.8	4.0	4.5	5.0
COZ	3.2	5.6	8.2	9.4	10.4

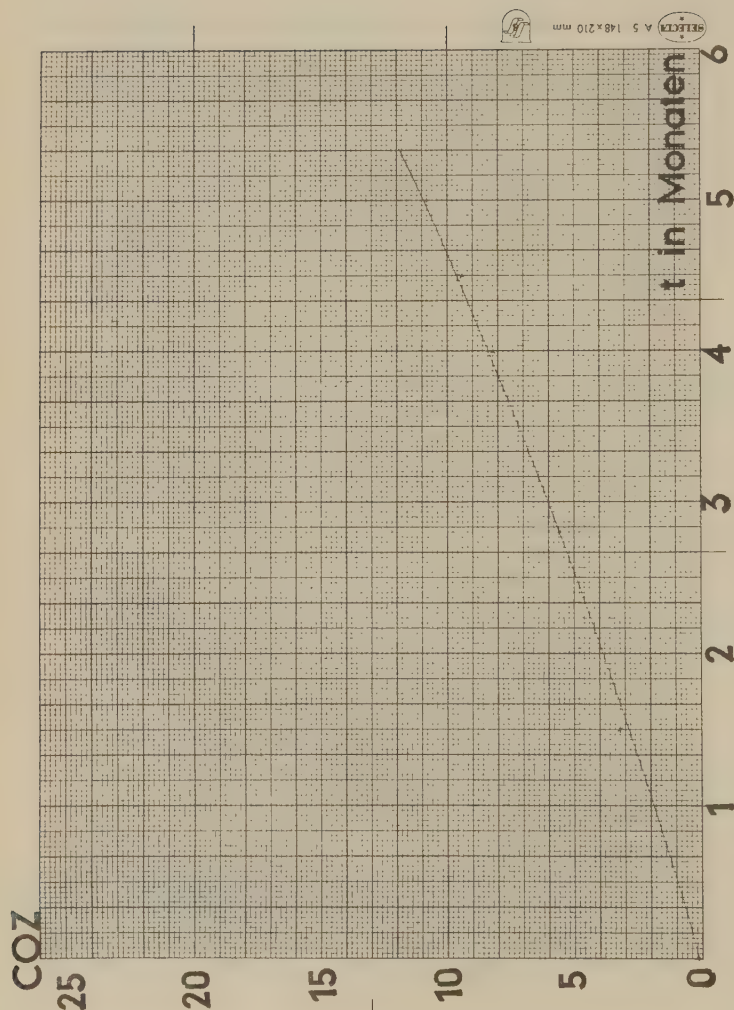


Abb. 11 Graphische Darstellung der CO₂-Erhöhung während der natürlichen Alterung von Wollfett

Wie die nach 5-monatiger Lagerung des Wachses ermittelte COZ zeigt, enthielt das in 3.1 beschriebene Ausgangsmaterial eine noch größere Carbonylmenge.

Bei der Isolierung und Konstitutionsaufklärung der in dem "natürlich" gealterten Wachs entstandenen Carbonylverbindungen wurden die gleichen Methoden wie bei der Untersuchung des eigentlichen Ausgangsmaterials angewendet. Auch wurden hier die gleichen Aldehyde und Ketone gefunden.

3.4.2 Untersuchung von " künstlich " gealtertem Wollfett

Unter "künstlicher" Alterung wird die Begasung des in 3.4.1 erwähnten Wollfetts in leichtgeschmolzenem Zustand verstanden. Gesteigerter Wert wurde auf die flüchtigen Carbonylverbindungen, nicht auf die Steroidketone, gelegt. In einer hinter der Begasungsflasche angeschlossenen Waschflasche, in welcher sich eine wässrige, schwefelsaure 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung befand, wurden die leichtflüchtigen Carbonylverbindungen aufgefangen und sofort in ihre Hydrazone überführt.

Nach achttägiger Begasung hatte sich ein beträchtlicher Niederschlag an DNP-Hydrasonen angesammelt. Der Niederschlag wurde abfiltriert; durch Kombination von DCh und Säulenchromatographie konnte das Gemisch in seine einzelnen Bestandteile aufgetrennt werden. Bei der Säulenchromatographie nach D.C. B u s s und Mitarb. (63) verwendet man als Säulenfüllmittel trockenes Magnesiumsulfat, als Verteilungsmittel Petroläther und als Elutionsmittel Mischungen verschiedener Konzentrationen von Petroläther mit Benzol, Benzol allein usw. Das in einem Mörser zerkleinerte Magnesiumsulfat z.A. "Merck" wurde 1-2 Std. lang bei 200° C im Trockenschrank getrocknet, langsam im Trockenschrank auf Zimmertemperatur abgekühlt und erneut in einem Mörser verrieben. Das mit Petroläther be-

feuchtete Säulenfüllmaterial wurde in die Säule eingeschwenkt, mit einem Korken, der an einem Glasstab befestigt war und der den gleichen Durchmesser wie die Säule hatte, festgestoßen und die Lösung der DNP-Hydrazone in Petroläther auf die Säule gegeben. Di- oder Oxy-carbonylverbindungen sind in Petroläther schwer löslich und konnten so zum größten Teil von den Monocarbonylverbindungen abgetrennt werden. Da die Auftrennung der Stoffe nicht in einzelnen Banden erfolgte, sondern eine einzige breite Zone sich über die gesamte Säule zog, mußten die Einzeleluate eingeengt und pc mit einander verglichen werden. Meist war eine zweite oder dritte Säulentrennung nötig, um die Stoffe einigermaßen rein zu erhalten.

Die Trennung von Äthanal- und Azeton- einerseits und Azeton- und Isobutanal-DNP-Hydrazone andererseits konnten auf Dünnschichtplatten mit Benzol als Fließmittel auseinandergesogen und isoliert werden. Eine weitere Möglichkeit stellte die kürzlich von H. Thaler und W. Saumwaber (70) entwickelte Methode kurzkettiger aliphatischer Monocarbonyl-DNP-Hydrazone dar, die bei Verwendung von Kieselgel G "Merck" mit einem Zusatz von Magnesiumoxyd z.A. "Merck" und einem Benzol/Chloroform/Alkohol- bzw. Cyclohexan/Chloroform/Alkohol-Gemisch als Fließmittel arbeitet.

Die Tab. 2 gibt die aufgetrennten und aus Äthanol (96Vol%) umkristallisierten Monocarbonylverbindungen, ihre Schmelzpunkte und Mischschmelzpunkte wieder. Neben den in 3.2.1 erwähnten Verbindungen konnte noch Mesityloxyd-DNP-Hydrazone kristallin erhalten werden. Außerdem wurden einige Hydrazone im Bereich von C_5 bis C_8 pc gefunden, es konnte jedoch wegen der geringen Substanzmenge nicht mit Sicherheit entschieden werden, um welche es sich handelt.

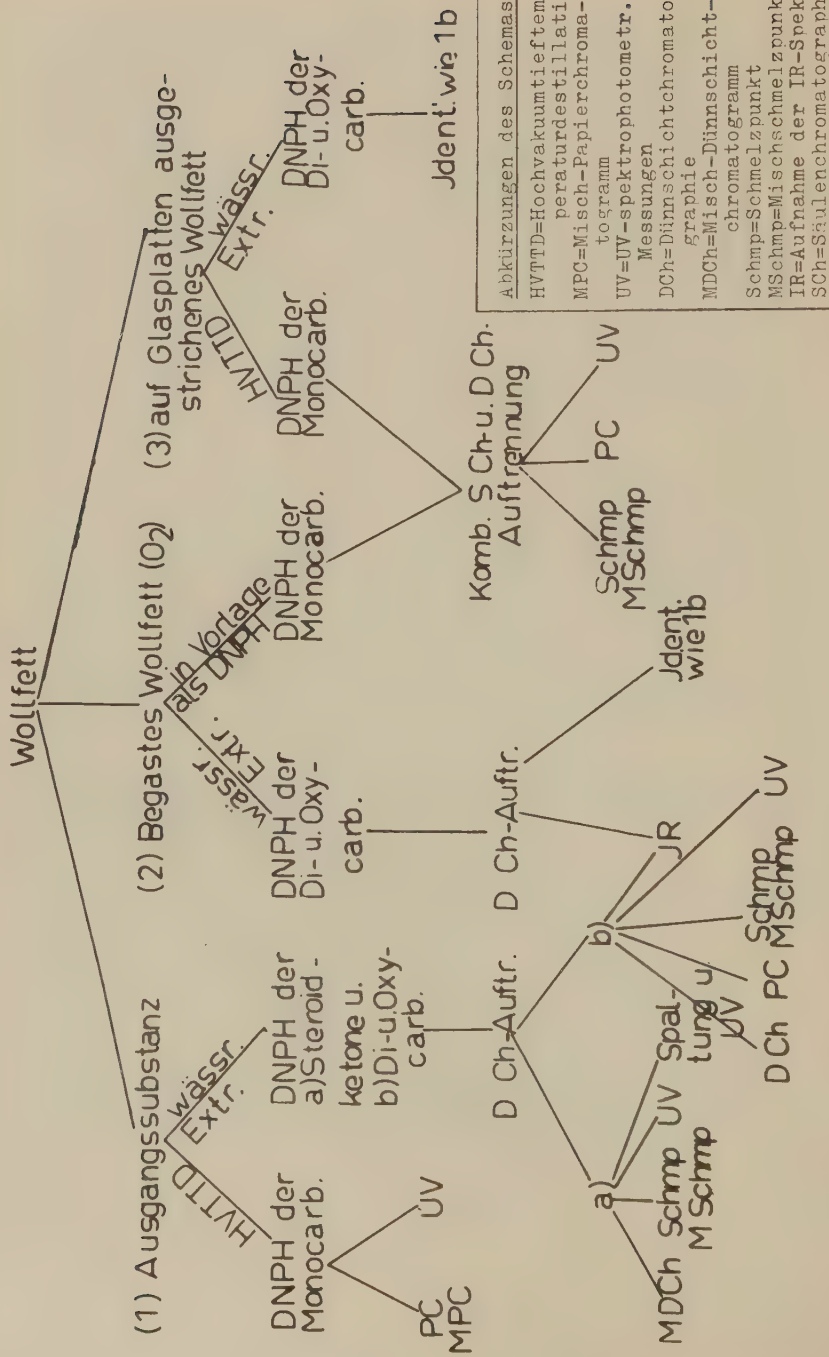
Tab. 2 Isolierte Monocarbonylverbindungen und die Schmelzpunkte und Mischschmelzpunkte der DNP-Hydrazone

	Schmelzpunkt	Mischschmelzpunkt
Methanal-DNP-Hydrason	164° C	164° C
Äthanal-DNP-Hydrason	163° C	163° C
Isobutanal-DNP-Hydrason	180° C	181° C
Pentanal-DNP-Hydrason	107° C	106° C
Hexanal-DNP-Hydrason	105° C	103° C
Heptanal-DNP-Hydrason	107° C	106° C
Azeton-DNP-Hydrason	124° C	124° C
Mesityloxyd-DNP-Hydrason	201° C	202° C

Das nachstehende Schema soll einen Überblick über die in dieser Arbeit verwendeten Gewinnungs-, Isolierung- und Identifizierungsmethoden geben. Die anschließend aufgezeichneten Tabellen enthalten die gefundenen DNP-Hydrazone mit den sie charakterisierenden physikalischen Daten.

Anmerkung: Die Schmelzpunkte dieser Arbeit wurden nicht korrigiert.

3.5 Schematische Zusammenfassung



Tab. 3 Übersicht über die gefundenen Steroidketone

zu Ia)	7-Ketocholesterin-DNP-Hydrazon	Cholesta-3,5-dien-7-on-DNP-Hydrazon	7-Ketocholesterin	Cholesta-3,5-dien-7-on
Schmp.	216° C	225° C	-	-
MSchmp.	215-216° C	224-225° C	-	-
Maxima	395 m μ	418 m μ	276 m μ	236,280 m μ
Minima	325 m μ	312 m μ	242 m μ	244 m μ

Tab. 4 Übersicht über die isolierten Di- und Hydroxycarbonylverbindungen

zu Ib)	Glyoxal-DNP-Hydrazon	Dihydroxyazeton-DNP-Hydrazon	unbekanntes DNP-Hydrazon (1)	unbekanntes DNP-Hydrazon (2)	unbekanntes DNP-Hydrazon (3)
Schmp.	328° C	304-305° C	-	-	-
MSchmp.	328° C	304° C	-	-	-
Maxima	394,438 m μ	394,438 m μ	394,438 m μ	394,438 m μ	394,438 m μ
Minima	410 m μ	410 m μ	410 m μ	410 m μ	410 m μ

3.6 Diskussion

Die Frage, die nach diesen Ergebnissen in der Diskussion im Mittelpunkt stehen soll, ist die nach den Ausgangsprodukten der Carbonylverbindungen. Am klarsten ist wohl die Entstehung der eindeutig nachgewiesenen Steroidketone des Cholesterins, dem 7-Ketocholesterin und dem Cholesta-3,5-dien-7-on. Nach Angaben von S. B e r g s t r ö m und O. W i n t e r s t e i n e r (95) wird bei der Begasung von Cholesterin mit Sauerstoff in wässriger Suspension das erstgenannte gebildet. Die theoretischen Grundlagen dieser oxydativen Veränderung des Cholesterins wurden hauptsächlich von G.O. S c h e n c k und Mitarb. geschaffen. Sie zeigten, daß aus Cholesterin ein Hydroperoxyd in 54-Stellung (111) entsteht, das wiederum durch eine Allylumlagerung in das entsprechende 7 α -Hydroperoxyd (23) umgelagert wird. Bei der Zerstörung des Hydroperoxyds wird 7-Ketocholesterin gebildet, das durch Abspaltung der alkoholischen Gruppe am C₃ und Ausbildung einer neuen Doppelbindung in das Cholesta-3,5-dien-7-on umgewandelt wird.

Wesentlich schwieriger dürfte die Herkunft der aliphatischen Carbonylverbindungen zu erklären sein. Die beiden Di- und Hydroxycarbonyle, das Glyoxal und das Dihydroxyazeton, konnten bei der Begasung von Cholesterin "Merck" aus wässriger Suspension nach Abfiltrieren des Sterins gefällt werden. Es ist anzunehmen, daß sie Spaltprodukte des Sterins darstellen, die aus der Seitenkette gebildet worden sind. Einleuchtend ist aber nur die Entstehung des Dihydroxyazetons aus der endständigen Isopropylgruppe über Azeton, das ebenfalls bei der Belüftung des Cholesterins isoliert werden konnte, während die Bildung des Glyoxals unklar bleibt. Ebenfalls möglich wäre die Abspaltung der gesamten Seitenkette des Cholesterins als Methylisohexylketon, das bei der Konstitutionsaufklärung der Seitenkette durch oxydative Spaltung gefunden, in dieser Arbeit jedoch nicht isoliert werden konnte. Das Ausgangsprodukt, wenigstens eines Teils des Azetons, kann ebenfalls, wie

bereits erwähnt, Cholesterin sein. Die Isosäuren des Wollfettes besitzen eine endständige Isopropylgruppe. Daraus kann, wenn eine alternierende β -Oxydation vorliegt, ebenfalls Azeton abgespalten werden. Es überrascht jedoch, daß das aus der endständigen Isobutylgruppe der Anteisosäuren abspaltbare Methyläthylketon nicht nachgewiesen werden konnte.

Über die Herkunft der Aldehyde können ebenfalls nur Vermutungen ausgesprochen werden, da, wie auch aus den bereits erwähnten Arbeiten über die Autoxydation gesättigter Fettsäuren hervorgeht, der Sauerstoff an allen C-Atomen der aus dem Wollfett isolierten Fettsäuren möglich ist. Es fällt auf, daß beim Vorkommen von Säuren mit einer C-Zahl von über 20 keine längerkettigen Aldehyde als die in dieser Arbeit isolierten aufgefunden wurden. Wird jedoch vermutet, daß die langkettigen Säuren bevorzugt gespalten, wie mehrere Autoren (74,75,77) bei ihren Oxydationsversuchen feststellten, und die gebildeten Aldehyde nicht erfaßt werden, sondern sofort wieder zur Säure oxydiert und erneut gespalten werden, so kann man die gebildeten Aldehyde als Spaltprodukte der langkettigen Säuren ansehen. Die entstandenen Dicarbonylverbindungen können ebenfalls als Oxydationsprodukte der gesättigten Fettsäuren aufgefaßt werden, ihr Bildungsweg ist jedoch noch unklarer als derjenige der Monocarbonylverbindungen.

Auf die Möglichkeit einer oxydativen Veränderung der Hydroxycarbonsäuren sei ebenfalls hingewiesen. A. R i e c h e und Mitarb. (108) machten die Feststellung, daß die Einführung einer OH-Gruppe in ungesättigte Fettsäureester in α -Stellung zu einer Doppelbindung die Sauerstoffaufnahme beschleunigt. Aus Alkoholen entstehen unter Sauerstoffaufnahme α -Hydroxyhydroperoxyde, die auch durch Addition von Wasserstoffperoxyd an Aldehyde und Ketone erhältlich sind und die wiederum leicht in Carbonylverbindungen und Wasserstoffperoxyd zerfallen. Sieht man von der "induktiven" Wirkung der benachbarten Doppelbindung, die dabei eine Rolle spielt, ab,

so muß man doch der oxydativen Veränderung der im Wollfett vorhandenen Hydroxycarbonsäuren, die etwa 45% ausmachen, Beachtung schenken. Durch Entstehung eines Peroxyds aus der Hydroxylgruppe kann sich die "Keimzelle" einer Kettenreaktion ausbilden, wobei die Peroxyde katalytisch wirken können.

Schließt man die anderen Inhaltsbestandteile des Waxes in die Betrachtungen mit ein, so gilt für die aliphatischen n-, Iso- und Anteisoalkohole wohl das gleiche, was über die gesättigten Fettsäuren gesagt wurde. Zu beachten ist ebenfalls die ungesättigte Seitenkette der beiden cyclischen Alkohole Lanosterin und Agnosterin, bei deren Spaltung sowohl Azeton als auch eine Dicarbonylverbindung entstehen können. Die phosphatidähnliche Substanz, dessen Einzelbestandteile auch autoxydativ verändert werden, spielt wohl nur eine untergeordnete Rolle, da sie in geringer Menge im Wachs vorhanden ist.

Zusammenfassend kann gesagt werden, daß die erwarteten Oxydationsprodukte des Cholesterins gefunden wurden. Über die Ausgangsprodukte der Paraffincarbonylverbindungen können nur Vermutungen ausgesprochen werden. In erster Linie kommen wohl hierfür die Seitenkette der Sterine und die Oxycarbonsäuren in Frage. Aber auch die aliphatischen Alkohole und Carbonsäuren können oxydativ in Carbonylverbindungen übergeführt werden.

	Seite
4 <u>Experimenteller Teil</u>	56
4.1 Gewinnungsverfahren	56
4.1.1 Hochvakuumtieftemperaturdestillation	56
4.1.2 Wässrige Extraktion des Ausgangsmaterials	57
4.2 Chromatographische Verfahren	58
4.2.1 Dünnschichtchromatographie	58
4.2.2 Säulenchromatographie nach D.C. Buss und Mitarb.	59
4.2.3 Angewandte pc Verfahren	61
4.2.3.1 PC der Monocarbonyl-DNP-Hydrazone	61
4.2.3.2 PC der Dicarbonyl-DNP-Hydrazone	61
4.2.3.3 Pc Auftrennung der DNP-Hydrazone der Steroidketone	63
4.3 Optische Messungen	63
4.3.1 UV-spektrophotometrische Messungen	63
4.3.2 Aufnahme der IR-Spektren	65
4.4 Halbsynthese verschiedener Steroidketone	67
4.4.1 Cholesterinketone	67
4.4.1.1 7-Ketocholesterinacetat	67
4.4.1.2 7-Ketocholesterin	69
4.4.1.3 Cholesta-3,5-dien-7-on	69
4.4.2 Lanosterinketone	69
4.4.2.1 Gewinnung von Isocholesterin aus Wollfettalkohol	69
4.4.2.2 Acetylierung des Isocholesterins	69
4.4.2.3 Hydrierung des Isocholesterinacetats zu seinen Dihydroverbindungen	70
4.4.2.4 Oxydation des Dihydrolanosterinacetats zu Lanost-8-en-7-on-3-ol- und Lanost-8-en- 7,11-dion-3-ol-acetat	70
4.4.2.5 Verseifung des Acetats	72
4.5 Spaltung der DNP-Hydrazone	72
4.5.1 Rückgewinnung der Ketosteroide	72
4.5.2 Spaltung des mit 5 bezeichneten DNP-Hydrazons	73

	Seite
4.6 Extraktion der Steroidketone als Girard P-Verbindungen aus Wollfett	74
4.7 Bestimmung der Carbonylzahl (COZ) nach R.C. Stillman und R.M. Reed	75
4.8 Begasung des Wollfettes mit Sauerstoff	76
4.9 Reaktion des Hochvakuumtieftemperatur- destillates mit Chromotropsäure zum Nachweis des Formaldehyds	76

4 Experimenteller Teil

4.1 Gewinnungsverfahren

4.1.1 Hochvakuumtieftemperaturdestillation (93)

In einem leeren Vakuumexsiccator mit seitlichem Anschluß wurden 3-4 Uhrgläser, bestrichen mit einer dünnen Schicht des Substrates, so übereinandergelagert, daß zwischen 2 Gläsern ein Zwischenraum von etwa 2 cm bestand. Der Exsiccator wurde mittels eines Druckschlauches mit einer dickwandigen, unten spitz zulaufenden Kühlfalle, in die ein mit Normalschliff N.S. 14,5 versehenes Durchleitungsrohr ragte, verbunden. Die Kühlfalle hing in einem Dewargefäß, das am Boden so weit mit einem Gemisch von Trockeneis und Methanol gefüllt war, daß das Ende des Einleitungsrohres und die Spitze der Kühlfalle auf eine Temperatur unter -50°C gebracht wurde. An die Kühlfalle wurde über eine Druckausgleichsapparatur mit seitlich angesetztem Quecksilbermanometer eine Ölpumpe angeschlossen. Die Ölpumpe hatte eine Maximalleistung von etwa 10^{-2} mm Hg.

Nach dem Erreichen der Tiefsttemperatur in der Kühlfalle, das ist nach etwa einer Stunde, wurde das System 48 Std. lang evakuiert. Nach jeweils 12 Std. wurde das Wollfett mit einem Spatel durchgerührt, um auch die im Innern sitzenden, flüchtigen Verbindungen absaugen zu können. Außerdem war ein zwischenzeitliches Auftauen des Destillates nach dem Abschalten der Ölpumpe nötig, um das im Einleitungsrohr gefrorene Material zu entfernen. Nach Beendigung der Destillation wurde das Glas etwas mit der Hand erwärmt, 1 ml einer frischbereiteten, kalten, schwefelsauren 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung (0,5 g 2,4-Dinitrophenylhydrazin wurden mit 2 ml konzentrierter Schwefelsäure verrieben und mit 2 ml Aqua dest. verdünnt) zugegeben und 2 Tage lang kühl und gut verschlossen stehen gelassen. Dann wurde die leicht getrübe Lösung mit Cyclohexan ausgeschüttelt und diese vor der pc Untersuchung auf einem Wasserbad konzentriert.

4.1.2 Wässrige Extraktion des Ausgangsmaterials

200 g Adeps lanae anhydricus wurden mit 250 ml Aqua dest. bis zur Verflüssigung des Wachses und darauf noch weitere 10 Min. lang unter häufigem Umschütteln auf dem Wasserbad am Rückflußkühler erwärmt. Nach längerem Abkühlen wurde die über dem Wasser hängende Wachsschicht durchstoßen, der wässrige Extrakt in einem Jodzahlkolben mit 2 ml Reagenzlösung (2,4-Dinitrophenylhydrazin/Schwefelsäure) versetzt und 2 Tage lang gut verschlossen aufbewahrt. Die Extraktion wurde noch dreimal wiederholt. Der ausgefallene Niederschlag wurde abfiltriert und das Filtrat noch einige Tage lang stehen gelassen, um eine vollständige Ausfällung zu erzielen. Nach mehrmaligem Waschen des Niederschlages zur Entfernung der Schwefelsäure wurde dieser im Trockenschrank bei 80° C getrocknet und mit Chloroform vom Papier gelöst. Der größte Teil des Chloroforms wurde abdestilliert und die so konzentrierte Lösung auf Dünnschichtplatten, bestrichen mit Kieselgel G "Merck", aufgetragen und chromatographiert.

4.2 Chromatographische Verfahren

4.2.1 Dünnschichtchromatographie

Bestreichen der Dünnschichtplatten:

16 g Kieselgel G "Merck" wurden mit 33 g Aqua dest. in einer Salbenschale mit einem Pistill angerieben und mit Hilfe eines Streichers auf Platten, die eine Größe von 21 x 23 cm hatten, aufgetragen. Nach 1/2 stündigem Trocknen im Trockenschrank bei 105-110° C wurden sie auf Zimmertemperatur abgekühlt.

Die DNP-Hydrazone des wässrigen Extraktes wurden in voller Breite der Platten aufgetragen und mit Chloroform "Merck" mit einem Zusatz von 1% Äthanol entwickelt.

Die leichtflüchtigen Carbonylverbindungen konnten mit Benzol als Fließmittel in 3 Gruppen aufgetrennt werden:
1. Methanal, Äthanal, Azeton. 2. Isobutanal 3. n-Hexanal, n-Heptanal und n-Pentanal.

Eine bessere Auftrennung der Monocarbonylverbindungen ergab die Methode nach H. T h a l e r und W. S a u m w e b e r (70). Die Platten werden mit einer Mischung von Kieselgel G "Merck" und Magnesiumoxyd z.A. "Merck" (Verhältnis 3:1) bestrichen. Die zum Anteigen verwendete Wassermenge wird nicht verändert. Als Fließmittel kommen in Frage:

Benzol: Chloroform: Äthanol (96Vol%) = 40:10:0,15

Cyclohexan: Chloroform: Äthanol (96Vol%) = 40:10:0,15

Das Fließmittel mit Benzol erwies sich für das Auftragen in voller Plattenbreite als günstiger als dasjenige mit Cyclohexan.

4.2.2 Säulenchromatographie nach D.C. B u s s und Mitarb. (63)

Säulenfüllung:

200 g Magnesiumsulfat z.A. "Merck" werden in einem Mörser gepulvert, 2 Std. lang bei 200° C im Trockenschrank getrocknet und nach erneuter Zerkleinerung mit Petroläther angeschlemmt. Das Material wird in kleinen Portionen in eine Säule mit einem Durchmesser von 4,5 cm und einer Länge von 25 cm gespült und festgestoßen.

Ausführung der Trennung:

Die bei der Begasung des Wollfettes aufgefangenen und als DNP-Hydrazone gefällten flüchtigen Carbonylverbindungen wurden mehrmals mit Petroläther am Rückflußkühler extrahiert, die petrolätherlöslichen Monocarbonylverbindungen auf die Säule gegeben und mit 400 ml Petroläther verteilt. Die Elution der einzelnen Aldehyde und Ketone wird in folgender Tabelle (Tab. 6) ungefähr wiedergegeben. Bei einer 2. und 3. Auftrennung der einzelnen Fraktionen überwog meistens eines der DNP-Hydrazone, so daß sie durch Umkristallisation aus Äthanol rein erhalten wurden.

Tab. 6 Säulenchromatographische Auftrennung der Monocarbonyl-DNP-Hydrazone

Elutions- mittel	Petroläther mit 10% Benzol	Petroläther mit 20% Benzol	Petroläther mit 40% Benzol	Petroläther mit 50% Benzol	Benzol	Äther
Menge des Elutions- mittels in ml	2 x 250	2 x 250	2 x 250	2 x 250	2 x 250	4 x 250
eluierte Verbin- dungen	Methanal	Methanal Azeton	Azeton	Azeton Äthanal	Äthanal Isobuta- nal Pentanal	Pentanal Hexanal Heptanal

4.2.3 Angewandte pc Verfahren

4.2.3.1 PC der Monocarbonyl-DNP-Hydrazone

Die pc Methode nach L. H o r n e r und K. K i r m s e (92) wird zur Auftrennung der DNP-Hydrazone "einfacher" Aldehyde und Ketone verwandt. Unter einfachen Carbonylverbindungen werden auch ungesättigte und verzweigte Kettenkohlenwasserstoffverbindungen, nicht aber cyclische, Di-, Hydroxy- oder Steroidcarbonylverbindungen verstanden. Bei aufsteigender Fließrichtung trennen sich die Carbonyle nur bis zu einer Kettenlänge von 8 Kohlenstoffatomen auf, während bei höherer C-Atomzahl (bis C₁₄) die absteigende Methode zu wählen ist. Wichtig ist das richtige Imprägnieren des Papiers. Nach dem Durchfeuchten mit der Azeton-Dimethylformamidlösung darf nicht länger als 3-4 Min. lang mit dem Auftragen der Substanzgemische und dem Einhängen in die Kammer gewartet werden, da sonst das Fließmittel sehr langsam läuft und die Auftrennung der niederen Homologen sich verschlechtert. Aus den gleichen Gründen darf die Sättigung der Papieroberfläche mit Wasserdampf nicht zu lange ausgedehnt werden. Bei der aufsteigenden Methode war diese Maßnahme nicht erforderlich.

4.2.3.2 PC der Dicarbonyl-DNP-Hydrazone

Die von W.J. S c h m i t t, E.J. M o r o c c o n i und W.F. O' C o n n o r (106) entwickelte Methode kann sowohl zur Untersuchung "einfacher" als auch von Di- und Hydroxyaldehyden und den entsprechenden Ketonen gebraucht werden. Eine Imprägnierung des Papiers ist nicht notwendig. Das Fließmittel ist täglich neu zu mischen. Das verwandte Papier von S c h l e i c h e r & S c h ü l l Nr. 2043b ist für die Methode weniger geeignet, da die aufgetrennten Flecke Schwänze zeigten. Jedoch war die Unterscheidung von Dihydroxyazeton- und Glyoxal-DNP-Hydrazon gut möglich.

Tab. 7 PC-Verfahren

Stoffgruppe	Fließmittel	Imprägnier- mittel	Methode	Laufzeit	Papier
Monocarbonyl- DNP-Hydrazone	Cyclohexan, gesättigt mit Dimethylform- amid	Azeton, Dime- thylformamid 1 : 1	aufsteigend, absteigend	4-6 Std. auf- steigend, 12-15 Std. oder 20 Std. im Durchlauf	Schleicher & Schüll Nr. 2043b, Mgl
Dicarbonyl- DNP-Hydrazone	Dibutyläther, Dimethylform- amid, Tetra- hydrofuran, 85 : 15 : 4		aufsteigend	4-6 Std.	Schleicher & Schüll Nr. 2043b, Mgl
Steroidketon- DNP-Hydrazone	Heptan, gesät- tigt mit Phenoxyäthanol	Azeton, Phenoxyäthanol 1 : 1	absteigend	20 Std. im Durchlauf	Schleicher & Schüll Nr. 2043b, Mgl

4.2.3.3 Pc Auftrennung der DNP-Hydrazone der Steroidketone

Die Methode wurde bisher hauptsächlich zur Auftrennung der DNP-Hydrazone von Sexualhormonen verwandt. Sie eignet sich weniger gut zur Auftrennung von zwei am gleichen C-Atom oxydierten Cholesterinketonen, noch weniger für Diketone, die im allgemeinen am Startpunkt sitzen bleiben.

4.3 Optische Messungen

4.3.1 UV-spektrophotometrische Messungen

Die Messungen wurden mit zwei verschiedenen Apparaten der Fa. B e c k m a n n I n s t r u m e n t s, München durchgeführt. Mit dem automatisch schreibenden UV-Spektrophotometer DB wurde jeweils das Gesamtspektrum der Substanz durchgemessen und auf einem Linekomb der Fa. H a r t m a n n & B r a u n, Frankfurt a.M. aufgenommen. Zur genaueren Ermittlung der Maxima und Minima wurde das UV-Spektrophotometer DU, an das ein Punktschreiber der Fa. H a r t m a n n & B r a u n angeschlossen war, verwendet. Aufschluß über die bei den einzelnen Stoffen genommenen Lösungsmittel und deren Maxima und Minima gibt die folgende Tabelle (Tab. 8).

Tab. 8 Übersicht über die UV-Messungen

Verbindungen	Lösungsmittel	Maxima	Minima
Monocarbonyl- DNP-Hydrazone	Äthanol 96 Vol%	ca. 360 m μ	ca. 300 m μ
Di- u. Hydro- xycarbonyl- DNP-Hydrazone	Dioxan	394,438 m μ	410 m μ
7-Ketochole- sterin	Dioxan	276 m μ	242 m μ
7-Ketochole- sterin-DNP- Hydrazon	Chloroform	395 m μ	325 m μ
Cholesta-3,5- dien-7-on	Dioxan	236,280 m μ	244 m μ
Cholesta-3,5- dien-7-on- DNP-Hydrazon	Chloroform	418 m μ	312 m μ

4.3.2 Aufnahme der IR-Spektren

Die IR-Spektren des Glyoxal- und des Dihydroxyazeton-DNP-Hydrazons wurden mit dem IR-Spektrophotometer Nr. 221 der Fa. P e r k i n - E l m e r * aufgenommen. Die Geschwindigkeit des Gerätes war auf 2 Min. pro μ eingestellt. Die Substanzeinwaagen betrugen bei dem Glyoxal-DNP-Hydrazon 0,9 mg, bei dem Dihydroxyazeton-DNP-Hydrazon 0,675 mg auf je 300mg Kaliumbromid. Zur Erläuterung der Spektren wird auf die folgende Tabelle (Tab. 9) hingewiesen.

Neben der Angabe der Maxima der Spektren läßt sich noch aus den Kurven entnehmen, daß das Spektrum des Glyoxal-DNP-Hydrazons eine deutlich größere Durchlässigkeit bei den aromatischen NO_2 - und aliphatischen CH-Doppelbindungsschwingungen zeigt, verglichen mit denjenigen des Hydroxyketon-DNP-Hydrazons, da der Dialdehyd zwei Dinitrophenylhydrazinreste enthält. Da die OH-Schwingung des Dihydroxyazetons sowohl beim authentischen als auch beim isolierten DNP-Hydrazon nicht auftritt, wird eine Wasserstoffbrückenbildung zwischen den beiden OH-Gruppen des Ketons und der Iminogruppe des Hydrazinrestes vermutet. Es besteht die Möglichkeit, daß die bei $2,8\mu$ auftretende H_2O -Bande, das entweder in der Substanz oder im Kaliumbromid noch vorhanden war, die OH-Schwingung überdeckt.

* Bodenseewerk Perkin-Elmer & Co., GmbH., Überlingen/See

Tab. 9 IR-Maxima

Schwingungen	aromatisches CH, 1,2,4-Substitution	aliphatische CH-Doppelbindung	aromatische C=C	aromatisches CH
Wellenlänge in μ	8,2 ; 8,75 ; 9,2 ; 9,5 ; 11,6 ; 12,0	3,42 ; 7,04	6,2 ; 6,67	3,24-3,25

Forts. Tab. 9

Schwingungen	aromatische C-NO ₂	aromatische N-C	aromatische NO ₂	NH	H ₂ O
Wellenlänge in μ	6,62	7,48	7,6	3,05-3,06	2,8

4.4 Halbsynthese verschiedener Steroidketone

4.4.1 Cholesterinketone

4.4.1.1 7-Ketocholesterinacetat

Zum Schutze der alkoholischen Gruppe wird das Cholesterin acetyliert. Man geht von 30 g Cholesterin aus, löst es heiß in 20 ml Essigsäureanhydrid und erhitzt 10 Min. lang am Rückflußkühler. Nach dem Abkühlen der Lösung fällt das Acetat in feinen Kristallen aus. Sie werden abgenutscht, zur Entfernung des größten Teils des Essigsäureanhydrids mehrmals mit Aqua dest. gewaschen und zwischen Filterpapier ausgepreßt. Nach zweimaligem Umkristallisieren aus Äthanol (96 Vol.%) erhält man 25 g Cholesterinacetat mit einem Schmelzpunkt von 114° C.

Zur Oxydation mit Chromsäureanhydrid (96) werden 21,4 g des Acetats in 230 ml Eisessig heiß gelöst und auf 55° C abkühlen gelassen. Zu dieser Lösung werden 1,5 g Chromsäureanhydrid in einem Gemisch von 10 ml Aqua dest. und 10 ml Eisessig tropfenweise unter Kühlung zugegeben und 2 Std. lang unter zeitweiligem Umrühren bei derselben Temperatur gehalten. Nach Zugabe von 10 ml Äthanol zur Zerstörung des überschüssigen Chromsäureanhydrids konzentriert man die essigsaure Lösung bis zur Kristallbildung, versetzt mit 20 ml Aqua dest. und läßt 24 Std. lang stehen. Die grüngefärbten Kristalle werden abgenutscht, mit Essigsäure und darauf mit Wasser gewaschen, in Äther gelöst und dieser im Abzug teilweise verjagt. Das Verdunsten des Äthers hat einen Wärmeentzug zur Folge, der das Auskristallisieren des größten Teils des 7-Ketocholesterinacetats fördert. Das Filtrat wird mit Äthanol versetzt und damit wird erneut ein Teil des Acetates ausgefällt. Da die Lösung immer noch eine geringe Menge des Syntheseproduktes enthält, verdünnt man

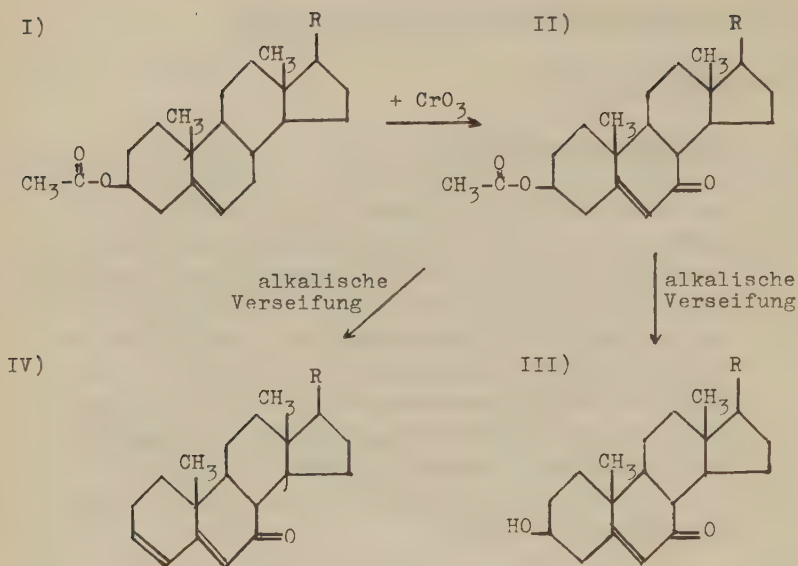
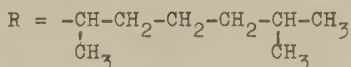


Abb. 12 Synthese von am C₇ oxydierten Cholesterinketonen

- | | |
|-----------------------------|----------------------------|
| I) Cholesterinacetat | III) 7-Ketocholesterin |
| II) 7-Ketocholesterinacetat | IV) Cholesta-3,5-dien-7-on |



mit Aqua dest., extrahiert mit Äther und schüttelt diesen zur Entfernung der restlichen Essigsäure zuerst mit Kochsalzlösung, darauf mit Sodalösung und erneut mit Kochsalzlösung aus. Nach dem Verjagen des Äthers wird mit Äthanol aufgenommen, die Substanz mit Wasser gefällt und aus verdünntem Äthanol umkristallisiert. Schmp.: 158° C. Ausbeute: 10 g.

Nach der Verseifung des Acetates erhält man sowohl das 7-Ketocholesterin als auch das Cholesta-3,5-dien-7-on. 2 g 7-Ketocholesterinacetat werden in 60 ml einer 1%igen alkoholischen Natronlauge 45 Min. lang am Rückflußkühler erhitzt. Nach dem Abkühlen der Lösung wird das Verseifte mit Wasser ausgefällt und abfiltriert.

4.4.1.2 7-Ketocholesterin

Ein Teil des Niederschlages wird aus Pentan mit wenig Ätherzusatz umkristallisiert. Schmp.: 170° C. Schmp. des DNP-Hydrazons: $215-217^{\circ}$ C.

4.4.1.3 Cholesta-3,5-dien-7-on (19)

Der Rest des Niederschlages wird in 100 ml Petroläther-Benzol (8%) gelöst, auf eine Säule (Durchmesser: 1,2 cm, Länge: 28 cm), gefüllt mit 15 g Aluminiumoxyd "Woelm", Aktivitätsstufe I, gegeben und mit 100 ml des Gemisches nachgewaschen. Nach Elution mit reinem Benzol wird das Eluat eingedampft und der Rückstand aus Azeton umkristallisiert. Schmp.: 112° C. Schmp. des DNP-Hydrazons: 225° C

4.4.2 Lanosterinketone

4.4.2.1 Gewinnung von Isocholesterin aus Wollfettalkohol

100 g Wollfettalkohole der Wollwäscherei und Kämmerei in Döhren bei Hannover werden mit 1000 ml Methanol extrahiert, der Rückstand wird noch zweimal mit je 500 ml des gleichen Lösungsmittels ausgekocht. Die ausgefallenen Sterine werden so lange aus Methanol umkristallisiert, bis das Cholesterin entfernt ist, und das reine Isocholesterin mit einem Schmelzpunkt von 138° C vorliegt.

4.4.2.2 Acetylierung des Isocholesterins

10 g Isocholesterin werden mit 60 ml Essigsäureanhydrid 10 Min. lang am Rückflußkühler erhitzt. Das Acetat wird zweimal aus Methanol umkristallisiert. Schmp.: $112-113^{\circ}$ C.

4.4.2.3 Hydrierung des Isocholesterinacetats zu seinen Dihydroverbindungen (109)

Die Hydrierung wird in einem doppelwandigen Schüttelgefäß mit Thermostatanschluß ausgeführt. An den inneren Teil des Gefäßes ist eine Gasometerglocke angeschlossen, in der sich mit Kaliumpermanganatlösung gewaschener Wasserstoff befindet.

0,3 g Platinoxid werden mit Eisessig in den inneren Teil des Gefäßes eingeschlämmt und eine essigsäure Lösung von 6 g Isocholesterinacetat zugegeben. Die Gesamteisessigmenge beträgt 110 ml. Nach der Entfernung der Luft mit Wasserstoff aus dem Reaktionsgefäß (Knallgasprobe!) und dem Erreichen der gewünschten Temperatur von 70° C im Thermostaten wird der Schütteltisch eingeschaltet und die Gasometerglocke angeschlossen. Nach 4 Std. wird die noch heiße Lösung vom Katalysator abfiltriert, die Lösung erkalten gelassen und der ausfallende Niederschlag abgenutscht. Der in der Essigsäure verbliebene Rest des Gemisches fällt man mit Wasser aus. Zur Abtrennung des gewünschten Dihydrolanosterinacetates wird aus Essigsäureäthylester umkristallisiert, wobei die schwerlösliche Lanosterinverbindung in langen Nadeln ausfällt. Schmp.: 145° C. Ausbeute: ca. 2 g.

4.4.2.4 Oxydation des Dihydrolanosterinacetats zu Lanost-8-en-7-on-3-ol- und Lanost-8-en-7,11-dion-3-ol-acetat(102)

2 g Dihydrolanosterinacetat werden in 60 ml Essigsäure (96%) heiß gelöst. Nach dem Abkühlen auf 40° C gibt man innerhalb von 10 Min. 0,6 g Chromsäureanhydrid in 3 ml Essigsäure (90%) ohne Temperaturerhöhung zu und rührt die Lösung 2 Std. lang bei der gleichen Temperatur. Zur Zerstörung des überschüssigen Chromsäureanhydrids werden 10 ml Äthanol (96 Vol%) zugegeben, die Lösung in Aqua dest. gegossen und mit Äther ausgeschüttelt.

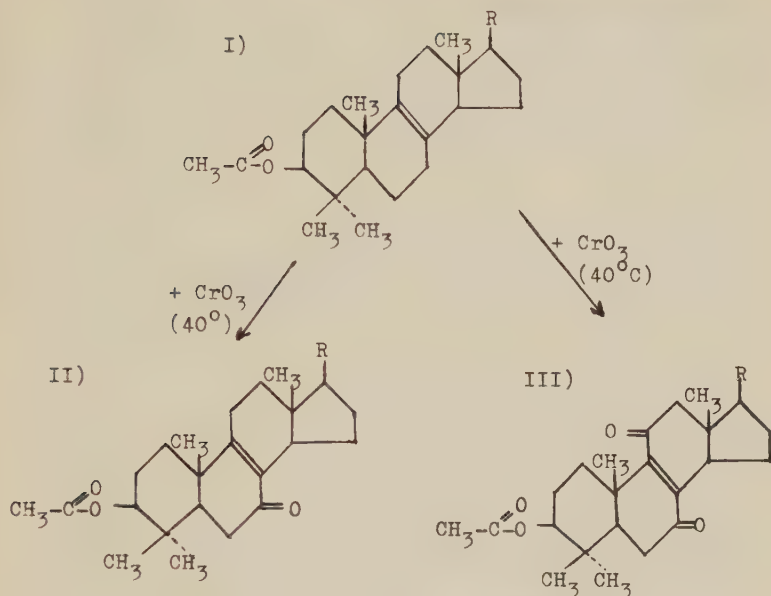


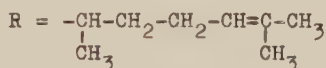
Abb. 13 Synthese der Lanosterinketone

I) Dihydrolanosterinacetat

III) Lanost-8-en-7,11-dion-

II) Lanost-8-en-7-on-3-ol-acetat

3-ol-acetat



Die ätherische Lösung wird mit verdünnter Natronlauge und Natriumcarbonatlösung neutralisiert. Der Äther wird verjagt, der Rückstand mit Hexan aufgenommen und auf eine Säule, gefüllt mit 30 g Aluminiumoxyd "Woelm", Aktivitätsstufe I, gegeben. Die Elution erfolgt mit Hexan; das Eluat wird eingedampft und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Weiße Kristalle. Schmp.: 152° C. Ausbeute: 0,1 g Lanost-8-en-7-on-3-ol-acetat.

Zur Elution des Diketons wird nun Benzol auf die Säule gegeben, das gelbe Eluat eingedampft und der Rückstand aus Äthanol umkristallisiert. Gelbe, feinfaserige Kristalle.

Schmp.: 157° C. Ausbeute: 0,5 g Lanost-8-en-7,11-dion-3-ol-acetat.

4.4.2.5 Verseifung der Acetate

0,2 g Substanz werden 15 Min. lang mit 20 ml einer 10%igen alkoholischen Kalilauge am Rückflußkühler verseift. Die Umkristallisation des Verseiften erfolgte aus Methanol.

Lanost-8-en-7,11-dion-3-ol: Lange, feine, filzige, weiße Nadeln. Schmp.: 146° C.

Lanost-8-en-7-on-3-ol: Eine Umkristallisation war wegen der geringen Ausbeute an Material nicht möglich. Das Keton wurde sofort als DNP-Hydrazone gefällt.

4.5 Spaltung der DNP-Hydrazone (104)

4.5.1 Rückgewinnung der Ketosteroide

47 mg der kurz hinter der Fließfront auf den Dünnschichtplatten laufenden DNP-Hydrazone werden in 8 ml Azeton gelöst, am Rückflußkühler erwärmt und eine Lösung von 0,65 g Zinn-II-chlorid z.A. "Merck" in 8 ml konzentrierter Salzsäure und 12 ml Aqua dest. zugegeben. Nach 15 Min. Kochen hat sich die Lösung entfärbt. Das Azeton wird auf dem Wasserbad abdestilliert, nach dem Abkühlen der Rückstand mit einem Gemisch von Petroläther-Benzol (8%) ausgeschüttelt und die beiden Steroidketone, wie unter 4.4.1.3 beschrieben, auf einer Aluminiumoxydsäule getrennt und das eluierte Cholesta-3,5-dien-7-on umkristallisiert. Das Benzoleluat wird konzentriert, und der Rest des Lösungsmittels auf einem Wasserbad verjagt. Nach dem Lösen des Rückstandes in ca. 10 ml Azeton fallen beim Abkühlen weiße Flocken aus, die sich abfiltrieren und mit heißem Azeton in ein Zentrifugenglas spülen lassen. Der ausfallende Niederschlag wird abzentrifugiert und das darüber stehende Lösungsmittel dekantiert. Nach weiterem Umkristallisieren konnte der Niederschlag in Dioxan gelöst und sein UV-Spektrum aufgenommen werden.

Die Gewinnung des 7-Ketocholesterins erfolgt durch anschließende Elution mit Äther und Äthanol. Beide Lösungsmittel werden verjagt, und die vereinigten Rückstände werden mehrmals aus einem Pentan-Äther-(1%)-Gemisch umkristallisiert. Die Bestimmung des UV-Spektrums erfolgt in Dioxan.

4.5.2 Spaltung des mit 5 bezeichneten DNP-Hydrazons (104)

21 mg dieses DNP-Hydrazons werden in 40 ml kochendem Eisessig am Rückflußkühler gelöst. Nach Zugabe einer Lösung von 0,65 g Zinn-II-chlorid z.A. "Merck" in 4 ml konzentrierter Salzsäure und 6 ml Aqua dest. erhitzt man 1 Std. lang am Rückflußkühler. Die Lösung entfärbt sich nicht vollständig. Nach dem Abkühlen wird die essigsäure Lösung auf das doppelte Volumen mit Aqua dest. verdünnt, mit Natriumchlorid gesättigt und nacheinander mit Äther, Chloroform und Petroläther ausgeschüttelt. Die Extrakte werden zur Entfernung der Essigsäure mit Natriumcarbonatlösung ausgeschüttelt, 24 Std. lang über bei 200° C getrocknetem Natriumsulfat getrocknet und die Lösungsmittel in einer Mikrovakuumdestillationsapparatur unter Verwendung einer Kühlfalle in Trockeneis-Methanol als Vorlage abdestilliert. Der in dem Kölbchen zurückbleibende, stark riechende Rückstand wird mit Wasser verdünnt und erneut als DNP-Hydrazon gefällt. Die abdestillierten Lösungsmittel werden mit einer alkoholischen 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung versetzt und 15 Min. lang am Rückflußkühler erwärmt. Die Identifizierung der rückgewonnenen bzw. entstandenen DNP-Hydrazone erfolgt mit Hilfe der DCh oder der PC (92).

4.6 Extraktion der Steroidketone als Girard P-Verbindungen aus Wollfett (105)

0,5 g Girard P-Reagenz ($[(\text{CH}_3)_3\text{-N}^+\text{-CH}_2\text{-CO-NH-NH}_2]\text{Cl}^-$) werden in 200 g Äthanol (96 Vol%) unter Zusatz von 5 g Eisessig heiß gelöst. In dieser Lösung werden 50 g Adeps lanae anhydricus 45 Min. lang auf dem Wasserbad am Rückflußkühler erwärmt. Nach dem Abkühlen auf Zimmertemperatur stellt man die Lösung eine Std. lang in den Eisschrank, um den größten Teil des herausgelösten Wachses auszufällen. Die dekantier- te Lösung wird mit Aqua dest. auf das doppelte Volumen auf- gefüllt, die wasserunlöslichen Verbindungen ausgesalzen und mit Äther ausgeschüttelt. Die wässrige Schicht, in welcher sich die Girard P-Sterinketonverbindungen befinden, wird mit 20 ml konzentrierter Salzsäure 15 Min. lang erwärmt, wobei die Ketone und Aldehyde wieder frei werden. Letztere werden mehrmals mit Äther ausgeschnüttelt; der Äther wird verjagt. Die Fällung der DNP-Hydrazone erfolgt in alkoho- lischer Lösung. Die wässrige Lösung verrührt man ebenfalls mit Reagenzlösung. Beide Fällungen werden dch untersucht.

4.7 Bestimmung der Carbonylzahl (COZ) nach R.C. S t i l l m a n und R.M. R e e d (89-91)

Hydroxylaminlösung:

40 g Hydroxylaminhydrochlorid "Merck" werden in 80 ml Aqua dest. gelöst, 800 ml Äthanol (95 Vol%) und 600 ml 0,5 n Natronlauge werden zugegeben. Es schließt sich eine Filtration an.

Bestimmung:

0,1 - 0,2 g Wollfett werden genau gewogen und in einem Jodzahlkolben mit 20 g Hydroxylaminhydrochloridlösung 2-3 Min. lang am Rückflußkühler in gelindem Sieden gehalten. Die bei der Reaktion des Reagenzes mit den Carbonylverbindungen freiwerdende äquivalente Menge Salzsäure setzt sich mit der Natronlauge der Reagenzlösung um und wird durch Rücktitration mit 0,5 n Salzsäure (Indikator: Methylorange) bestimmt. Zur Bestimmung des Blindwertes wird die Reagenzlösung ohne Wollfettzugabe auf die gleiche Weise mit 0,5 n Salzsäure titriert.

Die Acidität des Wollfettes, die Anlaß für ein ungenaues Ergebnis wäre, wird in äthanolischer Lösung durch Titration mit 0,5 n Natronlauge bestimmt; die Acidität des Äthanol wird in gleicher Weise ermittelt.

Berechnung:

$$\text{COZ} = 14 \cdot \frac{b - a}{E} - \text{COZ Ac.}$$

b = Verbrauch an 0,5 n Salzsäure in der Blindprobe

a = Verbrauch an 0,5 n Salzsäure im Hauptversuch

E = Einwaage

Die Acidität (=COZ Ac.) wird analog berechnet.

Definition nach R.C. S t i l l m a n:

Die Carbonylzahl nach R.C. S t i l l m a n und R.M. R e e d (89-91) gibt die Anzahl mg Natronlauge an, die der von 1 g Substanz Hydroxylamin gebundenen Menge CO äquivalent ist.

4.8 Begasung des Wollfettes mit Sauerstoff

200 g frisches Wollfett werden in einer Reibschale mit Wasser gesättigt. Nach dem Einfüllen in einen 1l-Kolben, der mit einem Durchleitungsrohr versehen ist, wird das Lanolin auf einem Wasserbad bis zu einer leichtflüssigen Konsistenz geschmolzen. Hinter dem Kolben befindet sich die gleiche Anordnung noch einmal. An den zweiten Kolben schließt sich eine Waschflasche, gefüllt mit einer schwefelsauren, wässrigen 2,4-Dinitrophenylhydrazinlösung, an. Nach 8-tägiger Begasung wird der in der Waschflasche ausgefallene Niederschlag der flüchtigen Carbonyle abfiltriert und nach seiner Lösung in Chloroform pc untersucht. Das Lanolin wird, wie unter 4.1.2 beschrieben, extrahiert, und nach Fällung der DNP-Hydrazone diese dch aufgetrennt.

4.9 Reaktion des Hochvakuumtieftemperaturdestillates mit Chromotropsäure zum Nachweis des Formaldehyds (110)

Zu 5 Tropfen des Destillates werden 1 ml einer wässrigen Chromotropsäurelösung (10%) und 5 ml konzentrierte Schwefelsäure 30 Min. lang auf dem Wasserbad erwärmt. Nach dem Abkühlen der violettgefärbten Lösung wird mit verdünnter Schwefelsäure (1+1) auf 20 ml aufgefüllt. Zur gleichen Zeit stellt man als Vergleich dieselbe Lösung mit einem Tropfen Formaldehyd aus einer Kapillare her. Da die Vergleichslösung zu intensiv gefärbt war, wurde sie mit verdünnter Schwefelsäure (1:10) verdünnt.

5 Zusammenfassung

Da mit dem Altern des Wollfettes starke geruchliche Veränderungen und eine Verharzung desselben eintreten, war die Bildung von Oxydationsprodukten mit Carbonylcharakter anzunehmen. Vorproben, durchgeführt in dem wässrigen Extrakt eines mehrere Jahre lang in einem geschlossenen Gefäß aufbewahrten Wollfettes, bestätigten die Vermutungen: Die mit fuchsinschweflicher Säure versetzte Probe zeigte eine deutliche Violettfärbung.

Die Gewinnung der Carbonylverbindungen aus dem oben erwähnten Ausgangsmaterial wurde den physikalischen Eigenschaften der erwarteten Carbonyle entsprechend durchgeführt. Die flüchtigen, kurzkettigen, aliphatischen Monocarbonylverbindungen konnten mit Hilfe der Hochvakuumtieftemperaturdestillation - Abdestillieren bei Zimmertemperatur bei einem Druck von 10^{-2} mm Hg und Auffangen des Destillates in einer Kühlfalle, deren Spitze in einem Trockeneis-Methanolgemisch hing - aus dem Wachs isoliert werden. Die in ihre DNP-Hydrazone überführten Verbindungen wurden nach dem pc Verfahren von L. H o r n e r und K. K i r m s e (92) sowohl in Vergleichs- als auch Mischchromatogrammen nachgewiesen. Zur Stützung der Ergebnisse dienten UV-spektrophotometrische Messungen. Da die Maxima der pc aufgetrennten und mit Äthanol (96 Vol%) aus den Chromatogrammen extrahierten DNP-Hydrazone im Bereich von 360 m μ lagen, konnte die Anwesenheit von ungesättigten Aldehyden und Ketonen ausgeschlossen werden. Neben den in kleineren Mengen auftretenden Carbonylverbindungen konnten Methanal, das auch mit der Chromotropsäurereaktion nachweisbar war, Äthanal, Isobutanal, n-Pentanal, n-Hexanal, n-Heptanal und als Keton Azeton eindeutig nachgewiesen werden.

Weniger flüchtige Carbonylverbindungen, die in Spuren auch in das Hochvakuumtieftemperaturdestillat übergingen, und die nichtflüchtigen Steroidketone wurden durch eine wässrige Extraktion aus dem ranzigen Wollfett und anschließender Fällung als DNP-Hydrazone abgeschieden. Zur Auftrennung der Hydrazone wurde ein DCh-Verfahren entwickelt, das die Isolierung eines

Dicarbonyl- und eines Dihydroxyketonhydrazons, sowie eines Gemisches von Steroidketonen gestattet. Daneben waren 3 weitere Hydrazone, die nicht kristallin gewonnen werden konnten, in der Lösung enthalten. Das Dicarbonyl- und das Dihydroxyketon-DNP-Hydraxon konnten mit Hilfe eines dch Mischchromatogramms zunächst als Glyoxal und Dihydroxyazeton identifiziert werden. Weitere Hinweise ergaben die PC nach W.J. S c h m i t t und Mitarb. (106) und UV-spektrophotometrische Vergleichsmessungen mit Dioxan als Lösungsmittel. Die endgültige Konstitutionsaufklärung brachte nach Umkristallisation aus Nitrobenzol die Aufnahme der IR-Spektren, verglichen mit den Reinstsubstanzen.

Die Identität der Steroidketone mit denjenigen, die D. D a n i e l und Mitarb. (19) in Wollfett fanden, zeigte die Spaltung in die Reinketone, deren säulenchromatographische Auftrennung und die Aufnahme ihrer UV-Vergleichsspektren, desgleichen die Bestimmung der Schmelzpunkte und Mischschmelzpunkte der synthetisierten und in ihre DNP-Hydrazone überführten Produkte. Als weitere Hinweise dienten dch Mischchromatogramme auf Kieselgel G-Platten mit Toluol als Fließmittel. Neben den erwähnten Steroidketonen, dem 7-Ketocholesterin und dem Cholesta-3,5-dien-7-on, wurde weiterhin ein Gemisch aus mehreren Steroidketon-DNP-Hydraxonen gefunden. Eine eindeutige Bestimmung derselben war nicht möglich, da die RF-Werte von 3 am C₃ oxydierten und halbsynthetisch dargestellten Cholesterinketon-DNP-Hydraxonen die gleichen waren. Möglicherweise handelt es sich um das ebenfalls von D. D a n i e l und Mitarb. nicht näher beschriebene Keton.

Außer dieser Verbindung konnten 3 weitere DNP-Hydrazone, bei welchen es sich, nach den beiden Maxima im UV-Bereich zu urteilen, wahrscheinlich um Di- oder Hydroxycarbonylverbindungen handelt, isoliert werden.

Neben der Bearbeitung des ranzigen Ausgangsmaterials wurde frisches Adeps lanae anhydricus sowohl in wässriger Emulsion in leichtgeschmolzenem Zustand mit Sauerstoff begast, als

auch auf großen Glasplatten ausgestrichen längere Zeit dem Luftsauerstoff ausgesetzt. Die erste Art der Behandlung wurde hauptsächlich zur Gewinnung einer größeren Menge an Mono- und Dicarbonyl-DNP-Hydrazonen, die zweite zur Verfolgung der Veränderung der Carbonylzahl, aber auch zur Isolierung und Untersuchung der entstandenen Carbonylverbindungen und Vergleich der Ergebnisse mit denen, die die Analyse des Ausgangssubstrates ergab, durchgeführt. Die bei der künstlichen Alterung, wie die erste Methode genannt wurde, in der Vorlage aufgefangenen und sofort in ihre DNP-Hydrazone überführten aliphatischen Monocarbonylverbindungen konnten durch Kombination von Säulen- und Dünnschichtchromatographie aufgetrennt werden und, soweit die Menge ausreichte, ihre Schmelzpunkte und Mischschmelzpunkte bestimmt werden. Die Ergebnisse der zweiten Methode, die als natürliche Alterung bezeichnet wurde, stimmten mit denen, die im Ausgangsmaterial erhalten wurden, vollkommen überein, obwohl das Ausgangsmaterial und das zur schnellen Alterung verwendete Wollfett Produkte verschiedener Herkunft waren.

Über den Ursprung der Zersetzungsprodukte wurden Überlegungen angestellt. Eine Festlegung der Ausgangsstoffe, aus denen die Oxydationsprodukte entstanden sind, ist nur bei den Cholesterinketonen möglich. Über die Entstehung der aliphatischen Mono-, Di- und Hydroxycarbonylverbindungen können nur Vermutungen angestellt werden, da bei oxydativen Veränderungen von gesättigten Verbindungen bisher kein bestimmtes Reaktionsschema aufgestellt werden konnte.

6 Literaturverzeichnis

- (1) F. Hartmann "Über den Fettschweiß der Schafwolle", Göttingen 1868
- (2) E. Schulze Chem.Ber. 5, 1075 (1872)
6, 201 (1873)
J. prakt.Chem. 7, 163 (1873)
9, 321 (1874)
- (3) A. Windaus Z.physiol.Chem. 192, 86 (1930)
R. Tschesche
- (4) L. Darmstädter Chem.Ber. 29, 618,1474 (1896)
J. Lifschütz
- (5) T. Kuwata J.Amer.chem.Soc. 60,559 (1938)
- (6) T. Kuwata J.Soc.chem.Ind.,Japan
Ü. Ishii 39B, 227 (1936)
- (7) A.W. Weitkamp J.Amer.chem.Soc. 67, 447 (1945)
- (8) G. Senft Dissertation, Frankfurt/M.1956
- (9) D.H.S. Horn Chem.and Ind. R27 (1956)
Y.Y. Pretorius
- (10) H.S. Williams African Ind.Chemist 3, 3 (1959)
- (11) J. Tiedt Chem.and Ind. 911 (1951)
E.V. Truter
- (12) A.W. Weitkamp U.S.P. 2, 594,481,598,953(1952)
N.J. Bowman
- (13) E.V. Rudloff Chem.and Ind. 338 (1951)
- (14) D.H.S. Horn Chem.and Ind. 670 (1951)
F.W. Hougen
- (15) K.E. Murray J.Amer.Oil Chemists'Soc.
R. Schoenfeld 29, 416 (1952)
- (16) J.C. Drummond J.Soc.chem.Ind.,London
C.L. Baker 48, 232 T (1929)
- (17) H.Janistyn Fette Seifen 47, 351,405(1940)
- (18) W. Füllberth Dissertation, Frankfurt/M.1962
- (19) D. Daniel Bull.Soc.Chim.biol.
E. Lederer 27, 218 (1945)
L. Valluz
- (20) A.H. Milburn "Woolwachs", Cleaver-Hume
E.V. Truter Press Ltd., S.49

- (21) A.H. Milburn "Woolwachs", Cleaver-Hume
E.V. Truter Press Ltd., S. 54
F.P. Woodford
- (22) D.H.S. Horn J.Sci.Fd.Agric. 9, 632 (1958)
- (23) G.O. Schenck Liebigs Ann.Chem. 603, 46 (1957)
K.Gollnick
- (24) W.O. Lundberg "Autoxidation and Antioxidants",
New York, 1962
- (25) R.T. Holman "Progress in the Chemistry of
W.O. Lundberg Fats and other Lipids", Pergamon
Press Ltd., London
- (26) C.E. Swift Oil and Soap 23, 355 (1946)
E.G. Dollear
R.T. O'Connor
- (27) C.E. Swift J.Amer.Oil Chemists'Soc.
E.G. Dollear 25, 39 (1948)
L.E. Brown
R.T. O'Connor
- (28) N.A. Khan J.Amer.Oil Chemists'Soc.
J.B. Brown 28, 105 (1951)
F.E. Deatherage
- (29) F.K. Kawahara J.Amer.Oil Chemists'Soc.
H.J. Dutton 29, 633 (1952)
J.C. Cowan
- (30) S.S. Chang J.Amer.Oil Chemists'Soc.
F.A. Kumerow 31, 324 (1954)
- (31) J.E. Coleman J.Amer.Oil Chemists'Soc.
H.B. Knight 32, 135 (1955)
D. Swern
- (32) H.T. Batings J.Amer.Oil Chemists'Soc.
36, 648 (1959)
- (33) C.H. Lea J.Soc.chem.Ind., London
52, 57 (1933)
53, 388 (1934)
- (34) E. Glimm Fette Seifen 48, 60 (1941)
A. Ellert
- (35) W. Feitknecht Helv.chim.Acta 24, 670 (1941)
- (36) E. Munin Fette Seifen 48, 697 (1941)
- (37) A. Tschirch Schweiz.Apotheker-Ztg.
A. Barben 62, 281 (1924)

- (38) K. Täufel Allg.Oel-u.Fett-Ztg. 27, 41 (1930)
- (39) H. Schmahlfuß Fette Seifen 43, 243 (1936)
A. Gehrke
H. Werner
- (40) A. Haller C.R.hebd.Séances Acad.Sci.
A. Lassieur 150, 697, 1013 (1910)
- (41) M. Stärkle Biochem.Z. 151, 371 (1924)
- (42) H. Schmahlfuß Margarine Ind. 25, 215, 242, 265
A. Gehrke (1933)
H. Werner Fette Seifen 43, 211, 243 (1936)
- (43) W. Franke Liebigs Ann.Chem. 533, 46 (1937)
D. Jerchel
- (44) S.L. Bigelow Z.physik.Chem. 26, 493 (1898)
- (45) C. Moureu C.R.hebd.Séances Acad.Sci.
C. Duffraisie 174, 258 (1922)
176, 624, 797 (1923)
178, 824 (1924)
Chem.Reviews 3, 118 (1927)
- (46) L.L. Davies Flavour 1, 27 (1938)
- (47) H.W. Ziels Oil and Soap 22, 327 (1945)
W.H. Schmidt
- (48) L.L. Davies Agric.Progress 7, 108 (1930)
- (49) F.R. Robertson Oil and Soap 12, 234 (1935)
J.H. Campbell
- (50) A.E. King u. Oil and Soap 10, 204 (1933)
Mitarb.
- (51) C.D. Evans J.Amer.Oil Chemists'Soc.
28, 68 (1951)
- (52) H.v.Pezold Fette Seifen einschl.Anstrich-
mittel 61, 1018 (1959)
- (53) A.I.Schepparts J.Amer.Oil Chemists'Soc.
B.F. Daubert 25, 113 (1948)
- (54) A.I. Schepparts J.Amer.Oil Chemists'Soc.
B.F. Daubert 27, 367 (1950)
- (55) R.I. Stauf J.Amer.Oil Chemists'Soc.
B.F. Daubert 27, 374 (1950)
- (56) F.K. Kawahara J.Amer.Oil Chemists'Soc.
H.J. Dutton 29, 372 (1952)

- (57) G. Hoffmann Nature (London) 185, 310 (1960)
- (58) G. Hoffmann J.Amer.Oil Chemists'Soc.
38, 1, 31 (1961)
- (59) C.E. Swift J.Amer.Oil Chemists'Soc.
R.T. O'Connor 26, 297 (1949)
L.E. Brown
E.G. Dollear
- (60) D. Lefort Bull.mens.inf.Iterg.
7, 383 (1953)
- (61) D. Lefort Bull.Soc.chim.France 69, (1956)
J. Sorba
- (62) J. Brekke J.Amer.Oil Chemists'Soc.
G. Mackinney 27, 238 (1950)
- (63) D.C. Buss J.Amer.Oil Chemists'Soc.
G. Mackinney 32, 487 (1955)
- (64) D.A. Forss J.Dairy Res. 22, 91, 345 (1955)
E.G. Dunstone
W. Stark
- (65) H.van Duin Neth.Milk Dairy J. 12, 81 (1958)
Ref.J.Amer.Oil Chemists'Soc.
35, 607 (1958)
- (66) E.A. Day J.Dairy Sci. 43, 585 (1960)
D.A. Lillard Ref.Fette Seifen einschl.
Anstrichmittel 64, 66 (1961)
- (67) A.M. Gaddis Science (Washington)
R. Ellis 126, 745 (1957)
- (68) A.M. Gaddis Food Res. 24, 283 (1959)
R. Ellis
G.T. Currie
- (69) A.M. Gaddis Food Res. 24, 392 (1959)
R. Ellis
- (70) H. Thaler Fette Seifen einschl.
W. Saumweber Anstrichmittel
63, 945, 1045 (1961)
- (71) E.H. Farmer J.chem.Soc. (London) 121 (1942)
A. Sundralingam
- (72) P. George Nature(London) 149, 601 (1942)
E.K. Rideal
A. Robertson
- (73) P. George Trans.Faraday Soc.
A. Robertson 42, 210, 217 (1946)

- (74) H.H. Zuidema Chem.Reviews 38, 197 (1946)
- (75) C. Paquot Bull.Soc.chim.France 172 (1950)
F. de Goursac
- (76) E. Leibnitz J.prakt.Chem. 6, 145 (1958)
- (77) V. Ramanathan J.Amer.Oil Chemists'Soc.
T. Sakuragi 35, 244 (1959)
F.A. Kumerow
- (78) J. Lifschütz Z.physiol.Chem. 141, 146 (1924)
- (79) C.H. Möllering Arch.Pharmaz. 269, 225 (1931)
- (80) E. Hardegger Helv.chim.Acta 26, 2205 (1943)
L. Ruzicka
E. Tagmann
- (81) H.W. Gillam J.Austr.chem.Inst.
14, 361 (1948)
- (82) G.S. Muirhead J.Pharmacy Pharmacol
K.H. Oberweger 1, 762 (1949)
D.E. Seymour
D. Simmonite
- (83) D.H.S. Horn Chem. and Ind. 524 (1956)
D. Ilse
- (84) D.H.S. Horn J.Sci.Fd.Agric. 9, 632 (1958)
- (85) L. Burchard Chem.Ber. 18, 1803 (1885)
- (86) G. Nitschke Faserforsch.u.Textiltechn.
10, 380 (1959)
- (87) E.W. Clark J.Pharmacy Pharmacol.
G.F. Kitchen 13, 172 (1961)
Übersetzung: Dtsch.Apotheker-Ztg.
51, 1639 (1961)
- (88) H.P. Kaufmann "Analyse der Fettprodukte",
Springer-Verlag
Berlin/Göttingen/Heidelberg
- (89) H.P. Kaufmann "Analyse der Fettprodukte"
Springer-Verlag
Berlin/Göttingen/Heidelberg
S. 564
- (90) F.C. Stillman Perfum.essent.Oil Rec.
R.M. Reed 23, 278 (1932)
- (91) W. Leithe Z.Unters.Lebensmittel
67, 441 (1934)

- (92) L. Horner
K. Kirmse Liebigs Ann.Chem. 597, 48 (1955)
- (93) F. Schams Dissertation, Frankfurt/M. 1961
- (94) W.S. Lynn jr.
L.A. Steel
E. Staple Analyt.Chem. 28, 132 (1956)
- (95) S. Bergström
O. Wintersteiner J.biol.Chemistry 141, 597 (1941)
145, 309, 327
(1942)
- (96) A. Windaus
H. Lettré
P. Schenk Liebigs Ann.Chem. 508, 105 (1933)
- (97) A. Windaus Chem.Ber. 39, 518 (1906)
- (98) H.H. Inhoffen Chem.Ber. 69, 1136 (1936)
- (99) A. Butenandt
J. Schmidt-Thomé Chem.Ber. 69, 882 (1936)
- (100) L.F. Fieser
M. Romero J.Am.chem.Soc. 75, 4716 (1953)
- (101) O. Diels
E. Abderhalden Chem.Ber. 37, 3099 (1904)
- (102) L. Ruzicka
E. Rey
A.C. Muhr Helv.chim.Acta 27, 472 (1944)
- (103) H. Neher
A. Wettstein Helv.chim.Acta 35, 276 (1952)
- (104) N.M. Cullinane
B.F.R. Edwards J.chem.Soc. (London) 1311 (1958)
Ref. C. 3790 (1959)
- (105) L.F. Fieser
M. Fieser Lehrbuch der org.Chem., Verlag
Chem., Weinheim/Bergstr. S.1147
- (106) W.J. Schmitt
E.J. Moriconi
W.F. O'Connor Analytic.Chem. 28, 249 (1956)
- (107) H.H. Strain J.Am.chem.Soc. 57, 758 (1935)
- (108) A. Riche
u. Mitarb. Fette Seifen einschl.Anstrich-
mittel 64, 356 (1962)
- (109) E.R. Marker
E.L. Wittle
L.W. Mixon J.Am.chem.Soc. 59, 1368 (1937)

- (110) D.F. Snell Colorimetric Methods of Analysis,
C.T. Snell Vol. III A, S. 252
- (111) G.O. Schenck Angew.Chem. 70, 598 (1958)
O.A. Neumüller Ann.Chem. 618, 202 (1958)
W. Eisfeld

Lebenslauf

Am 18. Juli 1933 wurde ich, Hermann Vögele, als Sohn des kaufmännischen Angestellten Wilhelm Adolf Vögele und dessen Ehefrau Katharina, geb. Gottschall, in Frankfurt a.M. geboren. Ich besuchte sowohl die Volksschule als auch das Realgymnasium in Langen/Hessen, wo ich im Frühjahr 1953 die Reifeprüfung ablegte. Im März 1955 bestand ich nach zweijähriger Praktikantenzeit in der Schwanen-Apotheke in Offenbach a.M. die pharmazeutische Vorprüfung. Im Wintersemester 1955 begann ich das Pharmaziestudium an der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt a.M. und legte im Sommer 1958 die pharmazeutische Staatsprüfung ab. Anschließend arbeitete ich in der Apothekenpraxis und erhielt im Herbst 1959 die Approbation als Apotheker. An dem Pharmazeutischen Institut der Johann Wolfgang Goethe-Universität (Direktor: Prof. Dr. C. Rohmann) setzte ich meine Studien fort und fertigte unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H. Janecke meine Dissertation an.

Herrn Prof. Dr. H. Janecke, meinem hochverehrten Lehrer und Doktorvater, möchte ich für seine Anregung und Anleitung zu dieser Arbeit meinen Dank aussprechen.

Meinem hochverehrten Lehrer, dem Direktor des Pharmazeutischen Instituts, Herrn Prof. Dr. C. Rohmann, danke ich für seine Unterstützung und freundliches Entgegenkommen.

